

Université de Montréal

Caractérisation et surexpression des fimbriae de type chaperon-placier de *Salmonella enterica* sérovar Typhi

par Yoan Houde

Département de microbiologie, immunologie et infectiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en microbiologie, immunologie et infectiologie

Août 2015

© Yoan Houde, 2015

Résumé

Salmonella enterica sérovar Typhi (*S. Typhi*) est l'agent responsable de la fièvre typhoïde et cause environ 200 000 morts et 27 millions de cas annuellement. C'est un pathogène entérique dont le réservoir est restreint à l'Homme. Les raisons de cette restriction d'hôte sont méconnues et pourraient dépendre de l'expression de facteurs d'adhésion à des étapes importantes au cours de la pathogenèse. L'annotation bioinformatique du génome de *S. Typhi* identifie 12 fimbriae de type chaperon-placier (FCP), un curli ainsi qu'un pilus de type IV. L'objectif de ce projet de recherche est d'étudier ces systèmes d'adhésion peu caractérisés.

D'abord, le niveau d'expression de ces gènes a été évalué dans différentes conditions de culture *in vitro* en utilisant une approche de gènes rapporteurs. L'expression des 14 systèmes d'adhésion a été détectée. Nos résultats indiquent qu'une carence en fer favorise l'expression des opérons *bcf* et *csg*. Indépendamment du fer, l'expression de *bcf*, *csg*, *pil*, *sef*, *sta*, *stc*, *stg* et *sth* est influencée par la richesse nutritive du milieu. L'incubation en milieu LB liquide favorise l'expression de la plupart des systèmes d'adhésion par rapport à un milieu LB liquide sans agitation ou un milieu LB solide. En somme, l'expression des systèmes d'adhésion de *S. Typhi* a été observée et est influencée par des conditions environnementales.

Dans un second volet, nous avons tenté de surexprimer les différents systèmes d'adhésion chez une souche d'*E. coli* ou de *S. Typhi* afimbriaire. Avec cette approche, nous avons été en mesure de démontrer que l'opéron *tcf* encode pour un fimbria fonctionnel que l'on a pu observer en microscopie électronique. L'expression de *tcf* chez une souche afimbriaire d'*E. coli* et *S. Typhi* a également diminué leur capacité d'adhésion à des cellules épithéliales intestinales humaines lors d'essais *in vitro*.

Nos observations démontrent que l'expression des systèmes d'adhésion retrouvés chez *S. Typhi* est influencée par les conditions environnementales. Au moins un de ces systèmes est fonctionnel. Ceci suggère une contribution des systèmes d'adhésion retrouvés chez *S. Typhi* lors de l'interaction de ce pathogène avec l'humain.

Mots-clés : *Salmonella enterica* serovar Typhi, fimbriae, expression génique, adhésion, surexpression, microscopie

Abstract

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) is the etiological agent of typhoid fever which causes more than 200 000 deaths and 27 million cases worldwide, mostly in south Asia. This pathogen can only cause significant symptoms in humans, which are the only recognized animal reservoir. This host restriction is not clearly understood and could depend on the expression of adhesion systems during critical pathogenesis steps. Bioinformatic studies on *S. Typhi* predict 12 chaperone-usher fimbriae, one curli and one type IV secretion system. The aim of the project was to study those poorly described adhesion systems using two different methodologies.

First, transcription levels were evaluated in different *in vitro* growth conditions using both *gfp* and β -galactosidase reporter genes. The expression of the 14 adhesion systems was detected, even if some of them were poorly expressed. The expression of *bcf* and *csg* was higher during iron-deficiency. Also, the availability of nutrients had an impact on *bcf*, *csg*, *pil*, *sef*, *sta*, *stc*, *stg* and *sth* expression, independently of the presence of iron. Most of the adhesion systems showed higher expression levels in liquid LB media with aeration compared to the same media without aeration or supplemented with agar.

Secondly, several *S. Typhi* adhesion systems were cloned into an inducible expression plasmid introduced in both an afimbriated *E. coli* K-12 strain (ORN172) and an afimbriated *S. Typhi* strain (ISP1820). This approach enabled us to directly observe the presence of *tcf* by electron microscopy. Furthermore, the expression of *tcf* was correlated with a reduction of the capacity of bacteria to adhere to INT-407 human intestinal epithelial cells in an *in vitro* assay.

In summary, this work demonstrates that the putative adhesion systems found in *S. Typhi* can indeed be expressed and this expression can be regulated by environmental signals. Furthermore, *tcf* encodes for a functional fimbria which has never before been observed. Taken together, our results suggest a significant contribution of the putative adhesion systems during normal pathogenesis.

Keywords: *Salmonella enterica serovar Typhi*, fimbriae, gene expression, adhesion, overexpression, microscopy

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Résumé..... | ii |
| Abstract..... | iii |
| Table des matières..... | iv |
| Liste des tableaux..... | vi |
| Liste des figures | vii |
| Liste des sigles et abréviations..... | ix |
| Remerciements..... | xii |
| Introduction et revue de littérature..... | 1 |
| Études épidémiologiques des salmonelloses | 3 |
| Origine phylogénique des salmonelles et de <i>S. Typhi</i> | 7 |
| Mécanismes moléculaires évolutifs | 8 |
| Traitements actuels et en développement contre la fièvre typhoïde | 12 |
| Méthodes de prévention actuelles | 18 |
| Filaments extracellulaires de type fimbriae et pili | 21 |
| Rôles des fimbriae..... | 26 |
| Structure et assemblage des fimbriae de type chaperon-placier | 30 |
| Expression des fimbriae..... | 33 |
| Mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des fimbriae | 34 |
| Problématique et objectifs..... | 37 |
| Matériel et méthodes..... | 38 |
| Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture..... | 38 |
| Fusions transcriptionnelles <i>gfp</i> et <i>lacZ</i> | 40 |
| Courbes de croissance et surexpression des opérons fimbriaires. | 42 |
| Clonage des fimbriae. | 42 |
| Observation par microscopie électronique à transmission..... | 44 |
| Rapporteur d'expression β -galactosidase. | 44 |

| | |
|---|----|
| Rapporteur d'expression fluorescent (<i>gfp</i>)..... | 46 |
| Essais d'adhésion sur cellules épithéliales..... | 47 |
| Résultats..... | 48 |
| Profils d'expression des fimbriae..... | 48 |
| Rapporteurs β -galactosidase | 49 |
| Rapporteur d'expression fluorescent (<i>gfp</i>)..... | 53 |
| Mise au point du système d'expression inductible | 56 |
| Surexpression de l'opéron <i>tcfABCD</i> | 58 |
| Expression des opérons <i>bcf</i> , <i>sta</i> et <i>ste</i> | 60 |
| Effet de la surexpression sur la croissance et production de protéines fimbriaires | 63 |
| Essais d'adhésion | 65 |
| Discussion..... | 68 |
| Profil d'expression des fimbriae | 69 |
| Rapporteurs fluorescents (<i>gfp</i>)..... | 73 |
| Surexpression et synthèse des opérons fimbriaires..... | 74 |
| Essais d'adhésion aux cellules épithéliales..... | 74 |
| Conclusion et perspectives..... | 77 |
| Bibliographie..... | 79 |
| Annexe 1 : Éléments de régulation putatifs des promoteurs des FCP clonés à partir de <i>S. Typhi</i> | i |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I. Souches bactériennes | 38 |
| Tableau II. Plasmides..... | 41 |
| Tableau III : Amorces de clonage des promoteurs et opérons des fimbriae | 43 |
| Tableau IV. Prédiction des poids moléculaires et des fonctions des protéines des opérons des fimbriae de type chaperon-placier chez <i>S. Typhi</i> | 45 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Distribution géographique de l'incidence des cas de fièvre typhoïde. | 4 |
| Figure 2 : Proportion des décès de toutes les causes de mortalité regroupées par catégories dans la tranche d'âge 15-49 ans au niveau mondial. | 5 |
| Figure 3 : Arbre phylogénique de l'émergence temporelle des sous-espèces de <i>S. enterica</i> | 8 |
| Figure 4 : Mécanismes d'acquisition de matériel génétique par transfert horizontal. | 9 |
| Figure 5 : Distribution des pseudogènes acquis par <i>S. Typhi</i> et <i>S. Paratyphi A</i> | 10 |
| Figure 6 : Distribution géographique de la résistance aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement de la fièvre typhoïde. | 12 |
| Figure 7 : Première observation directe de la présence de fimbriae chez <i>E. coli</i> | 21 |
| Figure 8 : Observation directe des fimbriae par microscopie électronique. | 22 |
| Figure 9 : Arbre phylogénique des 35 types de FCP retrouvés chez les salmonelles. | 25 |
| Figure 10 : Structure et assemblage d'un fimbria de type chaperon-placier. | 31 |
| Figure 11 : Effet de la disponibilité en fer et en nutriments sur l'expression des fimbriae. | 50 |
| Figure 12 : Effet de l'agitation des cultures sur l'expression de fimbriae. | 51 |
| Figure 13 : Effet de la croissance en milieu solide sur l'expression des fimbriae. | 52 |
| Figure 14: Expression comparative des fimbriae entre <i>E. coli</i> et de <i>S. Typhi</i> | 53 |
| Figure 16 : Expression de l'opéron <i>stgABCD</i> dans quatre plasmides chez une souche d' <i>E. coli</i> afimbriaire (ORN172). | 57 |
| Figure 17 : Expression de l'opéron <i>tcfABCD</i> dans deux plasmides inductible à l'IPTG chez une souche d' <i>E. coli</i> afimbriaire (ORN172). | 58 |
| Figure 18 : Expression de l'opéron <i>tcfABCD</i> dans deux plasmides inductible à l'IPTG chez <i>S. Typhi</i> sauvage (WT) et afimbriaire ($\Delta 14$) sur gel d'acrylamide. | 59 |
| Figure 19 : Expression de l'opéron <i>tcfABCD</i> dans deux plasmides inductible à l'IPTG chez <i>S. Typhi</i> ISP1820 sauvage (WT) et afimbriaire ($\Delta 14$) sur gel de faible porosité (8%). | 60 |
| Figure 20 : Expression des opérons <i>bcfABCDEFGF</i> , <i>steABCDEF</i> et <i>staABCDEFGF</i> chez une souche d' <i>E. coli</i> afimbriaire (ORN172). | 61 |
| Figure 21 : Observation du fimbria <i>tcf</i> chez une souche afimbriaire d' <i>E. coli</i> ORN172 par microscopie électronique à transmission. | 62 |

| | |
|---|----|
| Figure 22 : Observation du fimbria Tcf chez une souche afimbriaire de <i>S. Typhi</i> par microscopie électronique à transmission. | 63 |
| Figure 23 : Inhibition de croissance provoquée par la surexpression de l'opéron <i>tcfABCD</i> chez une souche afimbriaire de <i>S. Typhi</i> | 64 |
| Figure 24 : Capacité d'adhésion d'une souche afimbriaire de <i>S. Typhi</i> modulée par l'expression de l'opéron <i>tcfABCD</i> | 66 |
| Figure 25 : Capacité d'adhésion d'une souche afimbriaire d' <i>E. coli</i> modulée par l'expression de l'opéron <i>tcfABCD</i> | 67 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|--------------------------------|--|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| Amp | Ampicilline |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ARN | Acide ribonucléique |
| Cm | Chloramphénicol |
| di-GMP | Di-guanoside monophosphate |
| D.O. | Densité optique |
| DS | Déviation standard |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| FCP | Fimbriae de type chaperon placier |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| IL | Interleukine |
| INF-γ | Interféron gamma |
| Kan | Kanamycine |
| kpb | Kilo paire de base |
| LB | Luria-Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MIP | <i>Macrophage inflammatory protein</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PBS-DOC | <i>Phosphate buffered saline-deoxycholic acid</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> |
| <i>S.</i> | <i>Salmonella</i> |
| SPI | <i>Salmonella pathogenicity island</i> |

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| SNT | Salmonelles non typhoïdales |
| SNTI | Salmonelles non typhoïdales invasives |
| SST3 | Système de secretion de type 3 |
| ST | Salmonelles typhoïdales |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF-α | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| UFC | Unité formatrice de colonie |
| VCS | Vésicule contenant des salmonelles |

«Equipped with his five senses, man explores the universe around him and calls the adventure Science.»

-Edwin Hubble (1889-1953)

Remerciements

Le travail qui mène à la rédaction d'un tel ouvrage demande un investissement en temps et en motivation colossal. J'ai eu au cours de ma maîtrise l'opportunité d'être soutenu d'une multitude de manières différentes et je souhaite succinctement remercier ces gens exceptionnels qui m'ont entouré.

J'ai pris beaucoup plaisir à travailler ou simplement avoir contact avec les étudiants, les stagiaires et les professeurs présents au département, soit pour brasser des idées sur mon projet ou les leurs ou simplement pour partager des anecdotes au quotidien. J'ai une pensée particulière à Catherine Gauthier et Maxime Raymond avec qui j'ai fait parcours depuis le baccalauréat mais aussi à tous les stagiaires qui ont mis pied dans notre laboratoire tels Claudie, Julie, Olivier, Jean, Jesse et plusieurs autres.

Je remercie toute ma famille et plus particulièrement mon père qui s'est toujours montrés disponible pour discuter d'un aspect ou d'un autre de mon projet et des difficultés que j'ai pu rencontrer.

Je remercie également Dr George Szatmari pour m'avoir donné des conseils et suggestions sur mon projet lors de notre rencontre à mi-parcours.

Finalement, j'aimerais de tout cœur remercier France pour d'abord cru en mes aptitudes (peut-être même plus que moi!) et de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour compléter ce programme dans une ambiance quotidiennement motivante. J'ai adoré l'aisance avec laquelle nous avons pu discuter, ne serais-ce que par curiosité, d'éventuelles expériences pouvant découler de mon projet en cours de route.

Je peux affirmer que mon parcours a été riche en expériences, tant humaines qu'en éprouvettes!

Introduction et revue de littérature

Les maladies infectieuses représentent la première cause de décès chez les enfants et la troisième cause au sein de la population mondiale selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Elles sont également la première cause de mortalité dans les pays en développement, principalement en raison d'un manque d'accès aux traitements à la pointe de la technologie actuelle. La lutte contre ces maladies s'appuie d'une part sur des méthodes de diagnostic précises et d'autre part sur la disponibilité de vaccins et d'antibiotiques efficaces. L'émergence de souches résistantes à l'arsenal thérapeutique rattrape les avancées médicales actuelles au point où des traitements alternatifs doivent impérativement être développés.

L'espèce *Salmonella enterica* regroupe de nombreux sérovars causant dans l'ensemble plus de 120 millions d'infections par année, bien que la plupart ne soient pas mortelles (Majowicz *et al.* 2010, Buckle *et al.* 2012). De ce nombre, environ 27 millions de cas sont causés par des sérovars causant une infection systémique mortelle connue sous le nom de «fièvre typhoïde». L'agent étiologique principal responsable est *Salmonella enterica* sérovar Typhi (appelé *S.* Typhi pour simplification), bien que les sérovars Paratyphi A, B et C peuvent aussi engendrer la même maladie. Cette maladie cause à elle seule environ 1% des décès à l'échelle mondiale chez les 15-49 ans (Lozano *et al.* 2012). Les régions endémiques se retrouvent principalement au sud de l'Asie, bien que cette maladie se retrouve partout ailleurs dans le monde. L'incidence de la fièvre typhoïde a grandement diminuée au cours du 20^e siècle en Amérique du nord, dans l'ouest de l'Europe et en Australie, probablement en raison de meilleures mesures sanitaires (Crump *et al.* 2004).

La pathogenèse de la fièvre typhoïde se distingue des autres salmonelloses par sa sévérité et le transit effectué par les bactéries. Sommairement, les salmonelles entrent chez leurs hôtes par voie orale et transitent jusqu'à l'intestin pour y établir une infection. Dans le cas de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, responsable de la majeure partie des salmonelloses non typhoïdales (SNT), cette infection reste confinée à l'intestin où elle cause une forte inflammation se manifestant au niveau clinique par une gastroentérite. Dans le cas des salmonelloses typhoïdales (ST), les bactéries se servent de l'intestin comme une porte d'entrée vers les organes lymphoïdes profonds. Elles seront internalisées mais non détruites par des

cellules phagocytaires qui s'y trouvent (macrophages et cellules dendritiques principalement). Ces phagocytes constituent le cheval de Troie des ST en leur permettant de se multiplier et se disséminer, ce qui mène à une fièvre et à de nombreux symptômes systémiques graves pouvant mener à la mort (Glynn et Palmer 1992, Wangdi *et al.* 2012).

Pour tout pathogène, la colonisation initiale d'un hôte nécessite des facteurs d'adhésion permettant d'interagir avec un ou plusieurs tissus rencontrés au cours de leur transit (Danne et Dramsi 2012, Hannan *et al.* 2012). Bien qu'ils ne soient pas les seuls facteurs d'adhésion, les fimbriae sont parmi les mieux décrits (Busch *et al.* 2015). Les nombreux sérovars de *Salmonella enterica* ont acquis une remarquable capacité d'adaptation à un large spectre d'hôtes au cours de l'évolution et possèdent un répertoire de fimbriae parmi les plus diversifiés du monde microbien (Wiedemann *et al.* 2014). Chez cette espèce, au moins 35 fimbriae de type chaperon-placier ont été identifiés par séquençage de génomes (Yue *et al.* 2012). Le séovar Typhi est cependant particulier, car il peut naturellement établir d'infection que chez l'humain. La combinaison unique des systèmes d'adhésion (12 fimbriae du type chaperon-placier ainsi que d'un pili de type IV et d'un curli), retrouvés chez *S. Typhi* pourrait expliquer, du moins partiellement, la restriction d'hôte de ce pathogène (Townsend *et al.* 2001).

Les fimbriae sont des structures assemblées sous forme de filaments extracellulaires pouvant atteindre une longueur de plusieurs micromètres. Pour leur plus grande partie, ils sont constitués de sous-unités répétitives qui présentent des propriétés immunogènes remarquables. En plus de leur rôle adhésif, ils peuvent parfois contribuer à la formation de biofilms, forme coloniale bactérienne persistante chez l'hôte ou dans l'environnement. Les fimbriae du séovar Typhi pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques appropriées pour l'élaboration de vaccins ou de traitements (Lillington *et al.* 2014).

Cependant, à un niveau plus fondamental, il est nécessaire de savoir dans quelle mesure les fimbriae confèrent un avantage à *S. Typhi* durant son interaction avec l'hôte. Pour ce séovar, l'étude des interactions hôte-pathogène s'effectue principalement à l'aide de modèles de cellules humaines en culture *in vitro* car aucun modèle animal n'a réconcilié les symptômes aigus présentés chez l'Homme (Edsall *et al.* 1960, Bhan *et al.* 2005). Des études précédentes dans notre laboratoire ont mis en évidence des défauts d'interaction chez des mutants de

fimbriae produits par génie génétique d'une souche clinique de *S. Typhi*. Notamment, certains de ces mutants démontraient un défaut d'adhésion ou d'invasion de cellules épithéliales intestinales. D'autres mutants étaient moins bien phagocytés par des macrophages activés ou survivaient moins bien au sein de ces cellules. De plus, cette même étude a détecté l'expression de quelques-uns des fimbriae dans des conditions expérimentales standard (David 2012).

Avant d'aborder le corps du travail effectué au cours de cette étude, certaines notions doivent être introduites pour cerner l'étendue des connaissances actuelles sur la fièvre typhoïde et plus encore sur les facteurs de virulence potentiels que sont les fimbriae. Quelques notions épidémiologiques de la maladie seront abordées. Nous expliquerons les méthodes de prévention et de traitement actuels afin d'en saisir les limites. Nous survolerons l'historique évolutif de cette espèce à partir de son ancêtre commun avec *E. coli*, ce qui donnera un aperçu des mécanismes ayant façonné son apparition. Plus près du sujet de recherche de ce travail, nous passerons en revue la structure et les fonctions attribuées à des fimbriae d'espèces apparentées à *S. Typhi*. Finalement, certains mécanismes de régulation de l'expression des fimbriae seront également discutés.

Études épidémiologiques des salmonelloses

Le nombre d'infections causées par *Salmonella enterica* est estimé à plus de 120 millions de cas par année et plus de 350 000 morts, toutes souches confondues (Majowicz *et al.* 2010, Buckle *et al.* 2012). De ce nombre, environ 27 millions de cas et 200 000 morts sont causées par des souches typhoïales (sérovares Typhi et Paratyphi principalement), presque exclusivement dans des pays où les mesures de contrôle sanitaire de l'eau et de la nourriture sont absents ou peu développés, surtout en Asie (Crump *et al.* 2004). Le dernier rapport mondial sur l'incidence des cas de fièvre typhoïdes date de la dernière décennie. On remarque que seule l'Europe de l'ouest, l'Australie et l'Amérique du nord sont somme toute épargnées par la fièvre typhoïde alors que le sud de l'Asie et les Philippines sont les régions endémiques les plus touchées (Figure 1). Ces chiffres démontrent bien l'étendue des problèmes engendrés par les salmonelles et la plus grande sévérité des cas de fièvre typhoïde comparé aux cas de gastroentérites. De plus, il est important de mentionner que des infections sub-cliniques

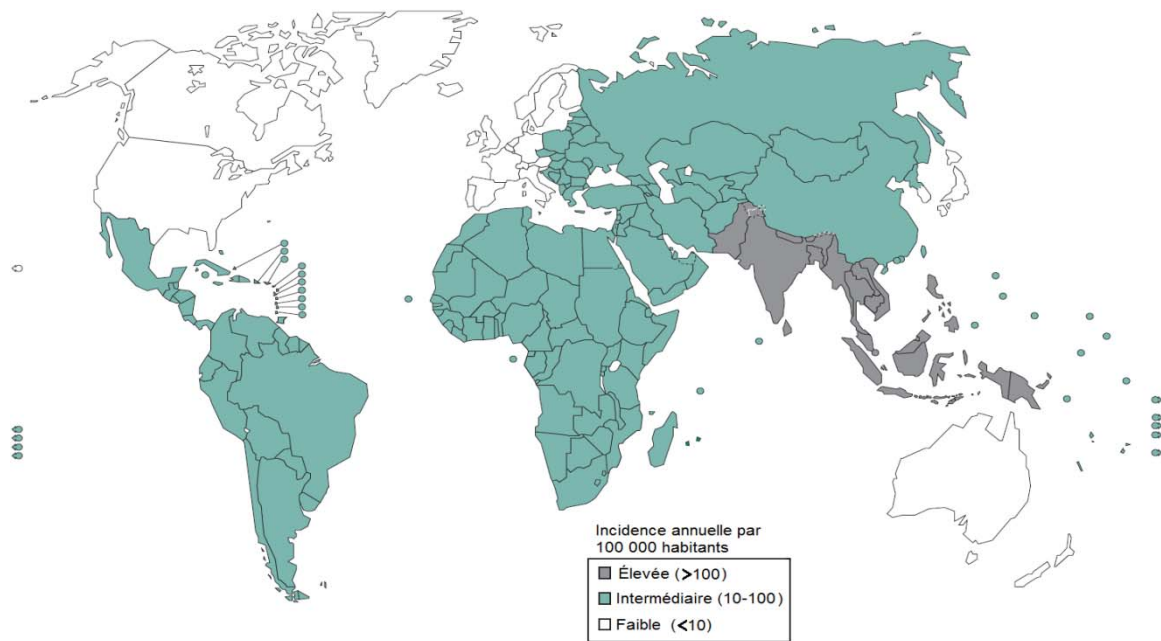


Figure 1. Distribution géographique de l'incidence des cas de fièvre typhoïde.

Les taux proviennent d'une méta-analyse compilant 22 articles. Adapté de (Crump *et al.* 2004) et publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

pourraient contribuer jusqu'à cinq fois le nombre de cas rapportés dans les régions endémiques (Mohan *et al.* 2006). Ces données sont probablement sous-estimées pour cette raison.

Il est intéressant de mettre en contexte l'ampleur des décès causés par la fièvre typhoïde. À cette fin, une étude récente a été publiée et répertorie au niveau mondial l'ensemble des causes de décès estimé, toutes causes confondues (Figure 2). Bien que la fièvre typhoïde soit loin du premier rang, elle est la cause d'environ 1% des fatalités chez la tranche d'âge 15-49 ans au niveau mondial, soit une proportion similaire aux hépatites ou au diabète.

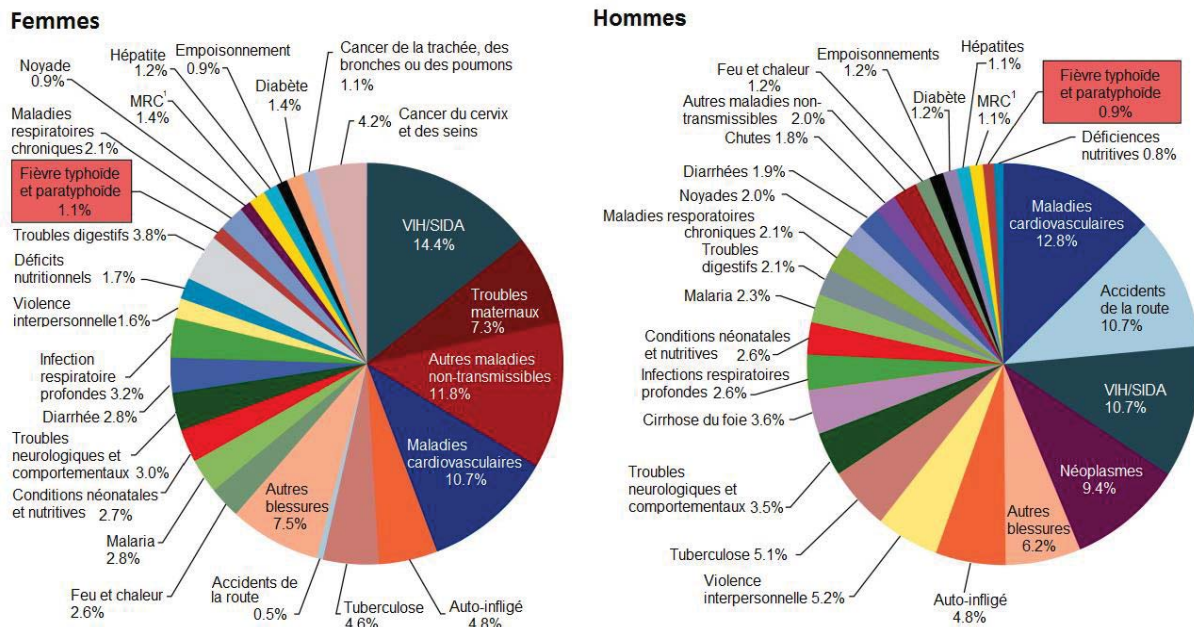


Figure 2 : Proportion des décès de toutes les causes de mortalité regroupées par catégories dans la tranche d'âge 15-49 ans au niveau mondial.

MRC¹: Maladies rénales chroniques. Adapté de (Lozano *et al.* 2012).

Afin de comprendre la propagation des cas de salmonelloses, il est important de bien cerner les vecteurs de transmission qui y participent. La famille des salmonelles regroupent de nombreuses espèces et sous-espèces qui n'engendrent pas toutes des pathologies. Les souches pathogènes peuvent se regrouper en trois classes : les salmonelles typhoïdales (ST), les salmonelles non-typhoïdales (SNT) et les salmonelles non-typhoïdales invasives (SNTI).

Deux sérovars sont des représentants classiques des SNT : Typhimurium et Enteritidis. De nombreux animaux (oiseaux, reptiles et mammifères) offrent des conditions propices à la prolifération et la dissémination de ces sous-espèces (Rabsch *et al.* 2002). La plupart des infections de SNT sont d'origine alimentaire. La plupart des autres cas sont causés par la transmission d'humain à humain (Majowicz *et al.* 2010). Il est intéressant de mentionner que certaines infections sont contractées suite à l'exposition à des animaux de compagnie reptiliens chez le quart des cas de salmonelloses pédiatriques en Angleterre (Nursing Standard 2015), ce qui en font des vecteurs non négligeables bien que le public en général soit peu éduqué à ce sujet.

Une catégorie de salmonelles encore méconnue, surtout présente en Afrique, peut causer une septicémie suite à l'invasion de l'épithélium intestinal. Peu de données spécifiques à ces SNTI sont disponibles par manque de méthodes de diagnostic. Il est facile de confondre les symptômes causés par les SNTI avec d'autres maladies endémiques, de sorte que beaucoup de cas doivent être attribués à une pneumonie sévère ou encore à la malaria (MacLennan et Levine 2013). Des études suggèrent que la prévalence de ces salmonelles en Afrique se situe de 388 à 530 par 100 000 enfants par année (Sigauque *et al.* 2009, Agnandji *et al.* 2011). Fait intéressant, les souches de SNTI retrouvées chez les animaux de ferme des familles où des cas de SNTI ont été déclarés sont distinctes, ce qui suggère que ces salmonelles ne sont pas des cas de zoonose.

Les ST regroupent les sérovars Typhi ainsi que Paratyphi A, B et C qui sont tous responsables de la fièvre typhoïde (parfois appelée paratyphoïde dans le dernier cas) (Bhan *et al.* 2005). Le sérovar Sendai a aussi sporadiquement été associé à des cas cliniques ressemblant à la fièvre typhoïde et pourrait être inclus dans ce groupe par extension (Gal-Mor *et al.* 2014). Dans le cas des ST, des exemples de vecteurs non humains (Krogh-Lund 1940, Kauffmann 1941, Onyango *et al.* 2009) ou environnementaux (Rani *et al.* 2014) ont été décrits mais ne seraient pas favorables à la prolifération des ST. Des chimpanzés ont également été expérimentalement infectés par *S. Typhi* et présentent des symptômes comparables aux cas légers chez l'humain mais ont dû être inoculés oralement à des doses massives (10^{11} bactéries) pour devenir porteurs (Edsall *et al.* 1960). À titre comparatif, la dose infectieuse orale chez l'Homme est d'environ 10^5 bactéries. Puisque les cas de fièvre typhoïde acquis par zoonose n'étant à peu près pas documentés, aucun réservoir de *S. Typhi* hormis l'Homme n'est reconnu.

Les personnes présentant des symptômes cliniques de fièvre entérique sont systématiquement contagieuses. De plus, 1 à 6% des personnes infectées par des ST deviennent des porteurs chroniques (Vogelsang et Boe 1948, Merselis *et al.* 1964). Ces porteurs sains peuvent excréter des quantités importantes de bactéries dans leur urine et fèces pendant plus d'un an, voir toute leur vie, sans pour autant avoir de symptôme ou un historique médical de fièvre entérique (Levine *et al.* 1982). Mary Mallon, surnommée "Typhoid Mary", fut un cas classique incontournable de porteuse saine qui vécut au début du 20^e siècle aux États-Unis. Une minutieuse enquête permis d'associer au moins 22 cas de fièvre typhoïde chez des familles

chez qui elle fut cuisinière. Elle est la cause la plus probable d'une éclosion de 3 000 cas à New York en 1907. Après une période de confinement de deux ans et de nombreuses tentatives de traitements, 120/163 échantillons de selles étaient positifs pour *S. Typhi*. Elle fut mise en isolement et elle mourut en 1938 d'une toute autre cause, puisqu'elle n'eut jamais manifesté de symptôme de fièvre typhoïde (Marineli *et al.* 2013, Gal-Mor *et al.* 2014).

Origine phylogénique des salmonelles et de *S. Typhi*

Une stratégie classique permettant de saisir les particularités d'une espèce est de comparer son génome avec d'autres espèces apparentées. L'origine évolutive du genre *Salmonella* par rapport à *E. coli* est estimée à partir de la variation de séquence moyenne au cours du temps et remonte à 100 à 160 millions d'années (Baumler 1997). Depuis, environ 1 000 gènes (~25%) auraient été acquis (Porwollik et McClelland 2003). Suivant la même approche de datation, l'émergence de *S. sérovar Typhi* par rapport à *S. enterica* remonte à 10 000-150 000 ans (Kidgell *et al.* 2002) et pourrait même être plus récente en raison du biais introduit par cette approche (Feng *et al.* 2008). D'autres méthodes d'analyse suggèrent une apparition plus antérieure (Figure 3), mais les différentes sources d'information disponibles suggèrent toutes que ce pathogène a fait une apparition relativement récente dans l'histoire évolutive. La proximité génétique entre les différentes souches de salmonelles est telle que la nomenclature les regroupe en deux espèces, *S. enterica*, comprenant six sous-espèces (*salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* et *enterica*) et *S. bongori*. *Salmonella enterica* sérovar Typhi fait partie de la sous-famille *enterica*. La divergence génétique entre ces sous-espèces est représentée dans la figure 3.

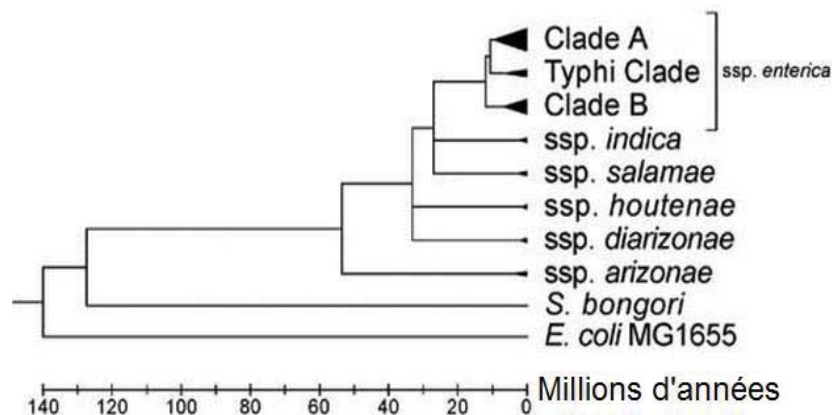


Figure 3 : Arbre phylogénique de l'émergence temporelle des sous-espèces de *S. enterica*.

Cet arbre est construit par la comparaison de substitutions synonymes de nucléotides dans 2025 gènes partagés. Adapté de (Desai *et al.* 2013).

Bien que ces sous-espèces soient regroupées, elles forment un groupe très diversifié, potentiellement en raison des environnements multiples qu'elles ont su coloniser à travers l'évolution. Actuellement, le centre de collaboration de référence et recherche sur les salmonelles de l'Organisation Mondiale de la Santé reconnaît 2659 sérovars basés sur la classification sérotypique de White-Kauffmann-Le Minor (Grimont et Weill 2007, Issenhuth-Jeanjean *et al.* 2014). Ceci reflète la diversité antigénique des flagelles et des lipopolysaccharides (LPS) que l'on retrouve chez les salmonelles et corrèle avec une adaptation à certains environnements ainsi qu'avec la pathogénicité de ces sérovars (Wattiau *et al.* 2011). L'adaptation à certains hôtes est également corrélée à l'acquisition ou la perte de gènes codant pour des fimbriae, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ces gènes sont important lors des relations hôte-pathogène.

Mécanismes moléculaires évolutifs

La spéciation est intimement liée à l'acquisition de nouvelles fonctions conférant un avantage évolutif. Dans le monde bactérien, ces acquisitions se font fréquemment par des échanges horizontaux de gènes, c'est-à-dire par transfert de matériel génétique d'espèces en cohabitation. Trois mécanismes principaux ont été décrits (Figure 4).

D'abord, il a été constaté que les bactéries sont intrinsèquement capables d'acquérir des gènes à partir d'ADN libre dans le milieu extracellulaire (Avery *et al.* 1944). Depuis cette découverte, de nombreuses techniques ont été élaborées et peaufinées pour utiliser les mécanismes de transformation bactérienne que l'on peut utiliser comme outils en génétique moléculaire (Sambrook et Green 2012).

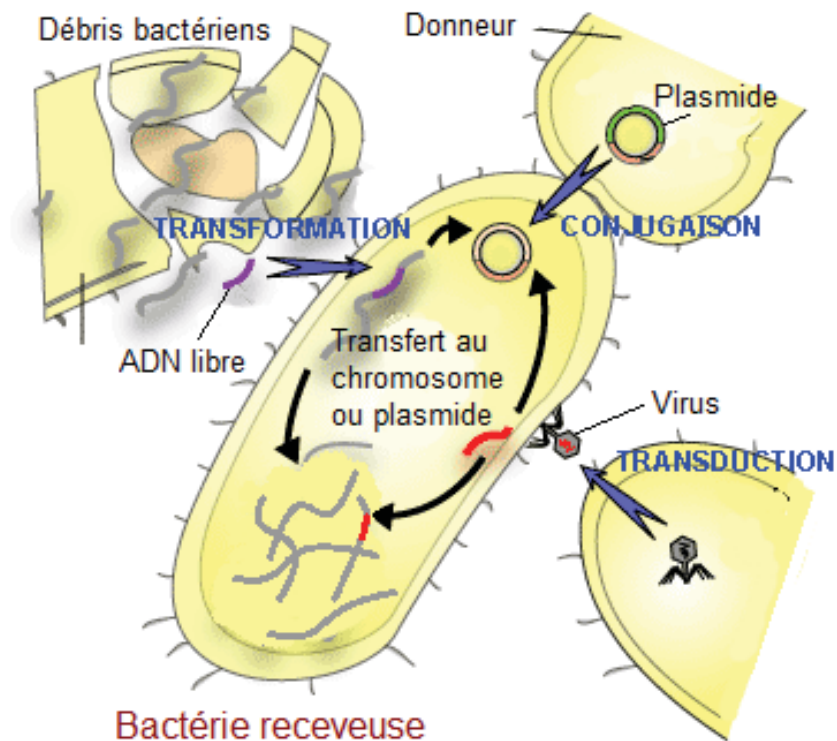


Figure 4 : Mécanismes d'acquisition de matériel génétique par transfert horizontal.

Adapté de <http://antibioticsfor.com/bacterial-mechanisms-of-antibiotic-resistance.phtml>

Certaines bactéries, comme les salmonelles et de nombreuses autres entérobactéries, possèdent un mécanisme actif de transfert d'ADN appelé conjugaison bactérienne. Cette machinerie de transfert a été d'abord décrite comme un fragment d'ADN autonome dénommé facteur F pouvant être transféré à une souche bactérienne ne le possédant pas et s'intégrer au génome (Lederberg 1947). Occasionnellement, le facteur F peut être excisé à nouveau du chromosome de manière imprécise et se retrouver sous forme libre porté par un plasmide. Ainsi, non seulement le facteur F peut être partagé entre bactéries, mais également des segments

génétiques adjacents pouvant coder pour de nouvelles fonctions chez la souche receveuse. Les bactéries doivent être à proximité et utiliser un système de sécrétion particulier nommé pili de conjugaison (Arutyunov et Frost 2013). Les bactéries peuvent également échanger du matériel génétique via un intermédiaire viral, les bactériophages. Ce transfert est nommé transduction et a historiquement été étudié chez les salmonelles en premier lieu et a ensuite été décrit avec plus de détails (Goodenough et Levine 1974). Le bactériophage laissera une signature témoignant de son passage dans le génome de la cellule hôte, ce qui permet de repérer ces événements. Ces trois mécanismes sont reconnus comme les principaux moteurs de l'évolution des ST au même titre que d'autres bactéries, bien qu'ils soient particulièrement favorisés par la proximité avec bon nombre d'autres organismes résidant dans le tractus intestinal de l'hôte (Porwollik et McClelland 2003). Ce ne sont cependant pas les seules formes d'adaptation encourues.

L'analyse des génomes de nombreux sérovars de *S. enterica* ainsi que ceux d'autres pathogènes à hôtes restreints indique que ces espèces subissent graduellement des mutations inactivant des gènes ou des opérons entiers, devenant ainsi ce que l'on appelle des pseudogènes. Ainsi, approximativement 4% du génome de *S. Paratyphi* et 5% de celui de *S. Typhi* est constitué de séquences inactivées par des séquences d'insertion de transposons, de gènes ou de fragments génétiques viraux ou encore par des mutations spontanées. Certains de ces pseudogènes sont partagés entre *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, soit parce qu'ils ont été acquis par un ancêtre commun, ou suite à des recombinaisons inter-espèce ou encore acquis indépendamment (Figure 5).

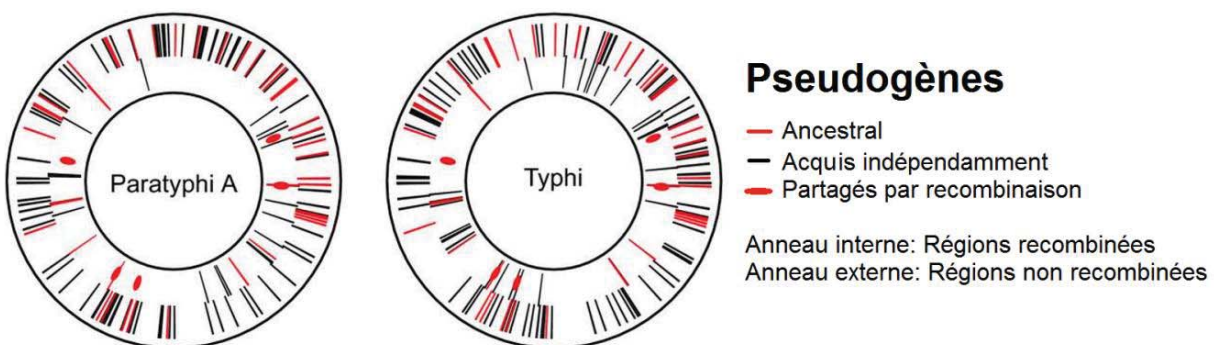


Figure 5 : Distribution des pseudogènes acquis par *S. Typhi* et *S. Paratyphi A*.

Adapté de (Holt *et al.* 2009).

À titre de comparaison, moins de 1% des gènes sont inactivés par les mêmes processus chez *S. Typhimurium* (Deng *et al.* 2003, Holt *et al.* 2009). La perte de fonction de ces gènes suggère qu'ils sont des candidats potentiels pour expliquer la perte de capacité infectieuse des ST chez des hôtes non-humains. Par exemple, la perte de *gtgE* chez *S. Typhi* le rend incapable de se répliquer dans des macrophages murins, bien que cette seule différence ne soit pas suffisante pour expliquer la restriction d'hôtes subie par les ST (Spano *et al.* 2011).

L'hypothèse la plus soutenue expliquant l'accumulation de pseudogènes est que des gènes servant à infecter d'autres hôtes ou à survivre dans l'environnement sont perdus puisqu'ils ne confèreraient plus d'avantage pour la bactérie (Holt *et al.* 2009). C'est en quelque sorte un élagage du matériel superflu. Ce phénomène est observé chez de nombreuses autres espèces adaptées à l'Homme, telles *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri* et *Mycobacterium leprae* (Wei *et al.* 2003, Wren 2003, Singh et Cole 2011). L'accumulation de pseudogènes n'est cependant pas exclusive aux pathogènes restreint aux humains, mais est plutôt associé à une adaptation à un environnement particulier. Par exemple, on observe une telle accumulation chez un autre sérovar de salmonelle, *S. Gallinarum*, qui n'infecte que la volaille ou encore chez *Buchnera aphidicola*, une espèce proche d'*E. coli* qui ne survit que dans un organe spécialisé chez les pucerons (Shigenobu *et al.* 2000, Feng *et al.* 2013).

Il n'est pas clair que l'annotation actuelle du génome représente fidèlement l'inactivation d'un gène. En effet, les mutations de type décalage du cadre de lecture et non-sens, décrivant respectivement un changement du cadre de lecture et un codon d'arrêt prématuré, peuvent tout de même donner naissance à des protéines. Dans le premier cas, le ribosome peut glisser sur l'ARN messager et continuer la synthèse du peptide malgré tout. Dans le second cas, il est possible que le ribosome incorpore plutôt un acide aminé modifié comme la sélénocystéine ou la pyrrolysine (Farabaugh 1996, Gesteland et Atkins 1996). Une étude protéomique a démontré l'existence de peptides spécifiquement produits par des régions annotées comme pseudogènes chez *S. Typhi*, *Typhimurium* et *Cholerasuis* (Feng *et al.* 2012). Bien que seule une faible proportion de peptides issus de pseudogènes putatifs aient été détectés dans cette étude, une seule condition de culture a été utilisée alors qu'il est reconnu que de nombreux gènes sont seulement exprimés à l'intérieur de macrophages ou encore lorsqu'exposés à d'autres conditions (Faucher *et al.* 2006). Il est donc possible que des rôles puissent être

associés à des séquences actuellement annotées comme pseudogènes et que cela contribue à notre compréhension de la dynamique évolutive chez le genre *Salmonella*.

Traitements actuels et en développement contre la fièvre typhoïde

La pression sélective exercée par l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement de la fièvre typhoïde a graduellement forcé l'émergence de souches résistantes. La distribution géographique de la résistance des souches de *S. Typhi* est illustrée dans la figure 6. Dans les régions endémiques, la résistance aux antibiotiques de première ligne (tétracycline, chloramphénicol, ampicilline) est commune, rendant ces antibiotiques inutilisables (Wang *et al.* 2014). Des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones suite à des mutations ponctuelles des cibles ont été décrits et rendent l'utilisation de ce traitement de moins en moins efficace (Gaind *et al.* 2006, Turner *et al.* 2006). Cet antibiotique est utilisé comme agent de première ligne dans les pays du sud de l'Asie.

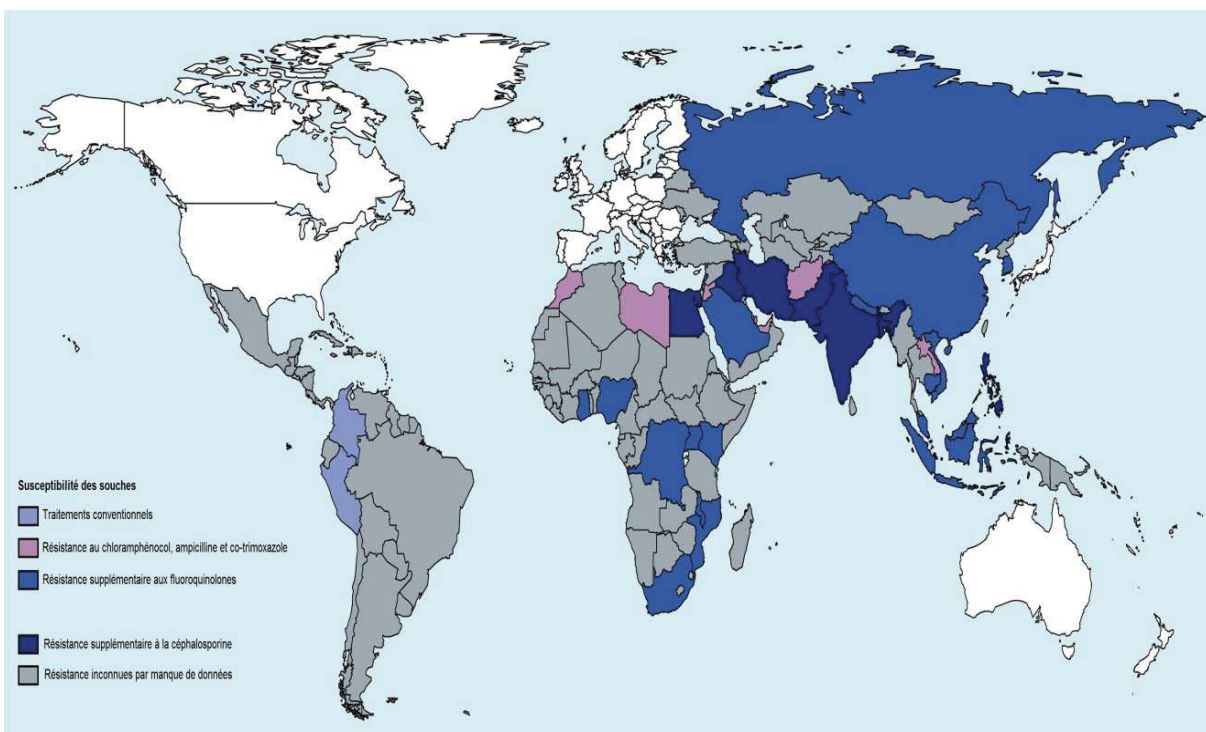


Figure 6 : Distribution géographique de la résistance aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement de la fièvre typhoïde.

Adapté de (Wain *et al.* 2014).

Le traitement des souches multi-résistantes s'effectue dorénavant avec des antibiotiques de la famille des céphalosporines dans plusieurs pays où le taux de résistance aux fluoroquinolones est élevé, dont l'Inde et le Pakistan (Effa et Bukirwa 2011). Plusieurs années se sont écoulées depuis l'utilisation répandue des céphalosporines dans les pays en développement où les suivis de médication et le dépistage systématique de la résistance aux antibiotiques sont souvent insuffisamment contrôlés et des souches multi-résistantes à cette famille d'antibiotique mènent à des échecs de traitements. L'azithromycine est donc utilisée dans les cas où ces derniers ne sont pas efficaces (Harish et Menezes 2015). Malgré son utilisation limitée, une récente étude met en évidence la dissémination de souches résistantes à l'azithromycine (63% des isolats) dans l'ouest de l'Inde (Vala *et al.* 2014). Les carbapénèmes et la tigécycline constituent actuellement des antibiotiques de derniers recours dans le traitement des ST (Capoor *et al.* 2009, Harish et Menezes 2015). Jusqu'à présent, les données disponibles indiquent un très faible taux d'échec de ces traitements, mais d'autres groupes d'entérobactéries démontrent une résistance accrue à ces antibiotiques, ce qui augmente considérablement les risques d'émergence de souches actuellement non traitables suite à un transfert génétique horizontal (Jean et Hsueh 2011).

L'élaboration de nouveaux antibiotiques peut se dérouler en cherchant de nouvelles molécules agissant sur les mêmes cibles que d'autres déjà connues mais possédant des structures assez différentes pour déjouer les différents mécanismes de résistance. C'est généralement ainsi que la nomenclature des générations de l'une ou l'autre des familles d'antibiotiques évolue dans le temps. La découverte de nouvelles cibles est habituellement un avancement plus significatif, ouvrant des possibilités accrues de traitement efficaces par absence de résistance préétablie (Xu *et al.* 2014). Parmi les cibles intéressantes, on dénote des composants de la paroi bactérienne, des sous-unités ribosomales, des enzymes de synthèse pour des voies métaboliques absentes chez l'humain, des systèmes de sécrétion à deux composantes, des ARN de transfert, des adhésines et même des messagers des systèmes de *quorum sensing* (Chopra et Reader 2014, Rao *et al.* 2014, Tang et Zhang 2014). Un récent article de revue couvre les grands axes de développement dans la lutte à la résistance aux antibiotiques (Tillotson et Theriault 2013).

En raison de l'intérêt économique du développement de médicaments, il y a des raisons de croire que le développement d'antibiotiques à large spectre soit plus attrayant que l'élaboration d'antibiotiques ciblant un petit groupe de pathogènes. Cependant, la résistance à un antibiotique à large spectre peut être partagée entre plusieurs espèces, rendant son utilisation peu efficace contre un grand nombre de pathogènes. La découverte de nouvelles cibles importantes dans la progression d'une pathologie particulière et la capacité grandissante des plateformes de criblage de petites molécules inhibitrices de manière automatisées et à haut débit ont le potentiel de pallier à ce problème, notamment en augmentant la capacité de prévoir les propriétés pharmacologiques (Wang et Hou 2015), en raffinant l'élaboration des bibliothèques de petites molécules chimiques (Foster *et al.* 2015) ou en combinant et optimisant plusieurs approches phénotypiques (Manjunatha et Smith 2014). L'accélération dans le développement d'anticorps monoclonaux (Razinkov *et al.* 2015) pourrait également faciliter la livraison de médicaments à des cellules cibles infectées (Niwa et Satoh 2015) ou ciblant directement les bactéries de par leur profil antigénique très distinct (Dadachova et Casadevall 2006, 2014). Ces avancées technologiques, couplées à d'autres avancées dans la modélisation et l'exploitation de données *in silico*, ont le potentiel de permettre de réagir à une nouvelle éclosion de manière très spécifique et en délai réduit par rapport aux approches classiques. Les peptides antimicrobiens AMP72, AMP126 et AMP2041 sont des exemples prometteurs issus d'analyses *in silico* et démontrent une efficacité bactéricide à large spectre et à faible concentration tout en possédant une faible activité cytolytique sur les cellules humaines (Romani *et al.* 2013). Une revue plus exhaustive des avancées en recherche de peptides antimicrobiens discute des limites générales de leur utilisation, soient leur susceptibilité aux protéases, leur toxicité potentielle et leur fort coût de production (Mendez-Samperio 2014). L'utilisation d'analyses *in silico* est également en cours pour trouver des inhibiteurs du régulon PhoP, élément clé pour la survie intracellulaire de *S. Typhi* (Kaur *et al.* 2015). L'utilisation de bibliothèques de phages exprimant des peptides capsulaires exogènes permet le criblage à large échelle de l'interaction de ces peptides avec des cellules cibles entières. Plusieurs groupes de recherche ont d'ailleurs découvert des peptides possédant des propriétés bactéricides chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Sainath Rao *et al.* 2013), *Campylobacter jejuni* (Bishop-Hurley *et al.* 2010), *Bacillus subtilis* (Knurr *et al.* 2003) ainsi que *Haemophilus influenzae* (Bishop-Hurley *et al.* 2005). Une autre stratégie est de contrer

des éléments clé de la pathogenèse tout en conservant l'intégrité et la viabilité des pathogènes. Des inhibiteurs de formation de biofilms qui empêche la colonisation et l'organisation des bactéries en communauté organisées, commencent à être explorés (Lo *et al.* 2014) ainsi que des inhibiteurs de FimH, une adhésine essentielle à l'attachement initial des *E. coli* uropathogéniques (Abgottspon et Ernst 2012).

La pathogenèse des salmonelles

Nous avons déjà distingué sommairement trois groupes de salmonelles présentant au niveau clinique des symptômes particuliers : les SNT, les ST et les SNTI. Tous ces pathogènes sont susceptibles d'être transmis par la voie orale-fécale, le plus souvent suite à l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée ou encore par contact direct avec un porteur. Ils possèdent des mécanismes leur permettant de survivre au pH acide de l'estomac ce qui leur permet d'atteindre le tractus intestinal.

Les ST et les SNT partagent plusieurs mécanismes d'adhésion et d'invasion de la muqueuse intestinale. Une partie de la machinerie requise se situe sur l'îlot de pathogénicité 1 (SPI-1), conservé chez salmonelles (Ochman et Groisman 1996). L'expression des gènes de cet îlot est induite par contact avec l'épithélium intestinal, ce qui déclenche l'assemblage d'un système de sécrétion spécialisé de type III (SST3), permettant d'injecter directement dans les cellules de l'hôte des effecteurs (Galan 2001, Mueller *et al.* 2008). De nombreux rôles ont été décrits pour ces effecteurs, dont le remodelage du cytosquelette d'actine par SopE/E2, SipA ou SipC et l'activation de Rho GTPase par SopB (Patel et Galan 2005). La motilité est également l'un des facteurs augmentant le succès invasif de *S. Typhi* (Liu *et al.* 1988), le plus probablement en augmentant la probabilité de rencontrer le tissu de l'hôte. Toute cette machinerie est finement régulée dans le temps et dans l'espace, ce qui permet globalement de pénétrer la barrière intestinale. Cependant, alors que les SNT y restent généralement confinées, causant une inflammation locale induisant une gastroentérite, les infections par les ST n'engendrent que peu d'inflammation localisée à l'intestin lors des stades précoces de la maladie. Cliniquement, ceci a pour conséquence d'observer l'apparition de symptômes dans un court délai, de l'ordre de 24 heures, suite à l'ingestion des souches de SNT, alors que l'infection passe généralement

inaperçue dans les premières deux semaines d'incubation chez les ST (Glynn et Palmer 1992, Wangdi *et al.* 2012). À noter que les patients infectés par SNTI présentent la plupart des symptômes ressemblant aux infections par des ST et que des symptômes gastro-intestinaux sont rarement présents.

Les ST minimisent les réactions immunitaires de l'hôte à l'aide de plusieurs mécanismes. L'une des adaptations importante de *S. Typhi* est l'acquisition du locus *viaB* conférant la capacité de synthèse d'une capsule de polysaccharides Vi. La présence de cette capsule est associée à une réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-22, TNF- α , IL-6, INF- γ , MIP-1/2, IL-8) via plusieurs mécanismes, dont la réduction de l'expression de la flagelline par le régulateur TviA (Raffatellu *et al.* 2007, Winter *et al.* 2008, Haneda *et al.* 2009).

La perte de la capacité de produire une très longue chaîne de l'antigène O suite à l'inactivation du régulateur FepE responsable de sa synthèse contribue également à l'efficacité de camouflage de la capsule Vi. Alors que l'introduction d'une mutation dans *fepE* chez *S. Typhimurium* n'a pas de conséquence sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de colite murine, une telle réduction est observée lorsque la capsule Vi est co-exprimée. Cette réduction de l'exposition de la partie externe du LPS diminue également la capacité opsonisante du complément *in vitro* (Crawford *et al.* 2013). Cette propriété a pour effet de diminuer l'attraction des neutrophiles *in vitro* et *in vivo*, attirés par le C5a, l'un des produits solubles dérivés de la cascade du complément (Wangdi *et al.* 2014).

La réponse immunitaire de l'hôte étant en grande partie abrogée, l'invasion intestinale par les salmonelles est suivie d'un passage du côté basal de l'épithélium selon plusieurs mécanismes potentiels. Tout d'abord, les salmonelles pourraient exploiter la fonction des cellules M des plaques de Peyer. Ces cellules ont pour fonction d'endocyter le matériel du lumen intestinal afin d'en dégrader le contenu et de présenter un répertoire de peptides à des macrophages du côté basal de l'épithélium (Jones *et al.* 1994, Kucharzik *et al.* 2000). L'internalisation forcée des salmonelles par les cellules M a également été démontrée et s'effectue par le mécanisme d'invasion par restructuration du cytosquelette d'actine décrit ci-haut. Une fois internalisé, tant *S. Typhi* que *S. Typhimurium* causent la mort cellulaire, ouvrant ainsi une brèche dans l'épithélium, ce qui permet à plus de bactéries de pénétrer (Kohbata *et al.* 1986, Jones *et al.*

1994). De plus, il a été démontré que *S. Typhimurium* peut être capturé directement dans le lumen intestinal par les cellules dendritiques (Rescigno *et al.* 2001). Un récepteur important, l'intégrine $\beta 2$ (ou CD18), est requis pour cette transmigration et ainsi la bactérie peut être disséminée de manière systémique dans un modèle murin (Vazquez-Torres *et al.* 1999).

Les salmonelles possèdent également des mécanismes de persistance dans les macrophages, cellule hôte classique permettant la dissémination systémique précoce. Le succès d'une infection est d'ailleurs dépendant de la capacité de ces dernières à modifier leur microenvironnement et de survivre et se répliquer dans des vésicules (VCS) (Fields *et al.* 1986, Figueira et Holden 2012). Ce réarrangement est médié par un second SST3 situé sur l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2), conservé chez *S. enterica* mais absent de *S. bongori* (Ochman et Groisman 1996). L'expression des gènes de cet îlot est induit par une faible concentration en ions phosphate et magnésium ainsi qu'un pH acide. Une récente étude a démontré par observation directe que la résistance de *S. Typhimurium* aux espèces réactives azotées et oxygénées au sein d'un macrophage est conférée par le SST3 de SPI-2 et que les VCS doivent demeurer intacts, sans quoi les salmonelles sont détruites (Heijden *et al.* 2015).

Une récente étude a également mis en évidence la fonction d'une toxine produite par *S. Typhi*. Cette toxine serait responsable de plusieurs des symptômes cliniques rencontrés (léthargie, stupeur et malaise) et contribuerait à atténuer les défenses immunitaires de l'hôte. La spécificité d'hôte de *S. Typhi* serait, au moins en partie, due à une glycosylation particulière des protéines de cellules humaines par l'acide N-glycolylneuraminique, absent chez la plupart des autres espèces animales (Deng *et al.* 2014).

La dissémination et prolifération systémique dans le système réticulo-endothélial (rate, foie, ganglions...) se poursuit pendant les premiers jours de l'infection, jusqu'à ce que des bactéries échappent aux macrophages et circulent librement dans le sang. C'est à cette étape que les symptômes cliniques de fièvre, fibrillation cardiaque et encéphalopathie apparaissent (House *et al.* 2001, Parry *et al.* 2002). Les ST peuvent également se loger au niveau de la vésicule biliaire et être relâchés dans l'intestin, où cette fois elles pourront causer des perforations intestinales (Dougan et Baker 2014). Des biofilms ont été observés sur les parois épithéliales de la vésicule biliaire ainsi que sur les calculs biliaires. Ces biofilms contribuent à la persistance des ST dans l'organisme (Gonzalez-Escobedo et Gunn 2013).

Méthodes de prévention actuelles

La prévention de la fièvre typhoïde par l'implantation de mesures sanitaires publiques, telles des systèmes d'aqueduc, d'égouts et de contrôle alimentaire, jouent un rôle primordial dans le contrôle de cette maladie (Brachman et Abrutyn 2009). Néanmoins, d'autres stratégies complémentaires ont émergées puisque les mesures sanitaires sont insuffisantes dans de nombreux pays.

Les premiers vaccins, introduits dès 1896, utilisaient des bactéries inactivées par différentes méthodes (chaleur, alcool, acétone ou phénol) et conféraient une protection appréciable de 73% sur trois ans. Cependant, une grande proportion (9-34%) de vaccinés montraient des symptômes systémiques de sévérité modérée et ces vaccins furent uniquement en usage chez le personnel militaire. Par conséquent, ces derniers ne furent jamais utilisés massivement comme mesure de santé publique (Fraser *et al.* 2007). Par conséquent, d'autres vaccins ont été développés. À l'heure actuelle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) licencie deux vaccins; Ty21a (souche atténuée; Vivotif) ainsi qu'un vaccin préparé à partir de la capsule Vi de cette première souche (Typhim Vi ou Typherix) (World Health Organisation 2014). Le vaccin Ty21a confère une protection combinée sur une durée de cinq ans de 67 à 89% (Fraser *et al.* 2007). Ce vaccin oral induit rarement plus que des symptômes bénins, mais doit être conservé réfrigéré et être assidument consommé à jeun en quatre doses administrées un jour sur deux, ce qui le rend difficile de distribution dans les pays endémiques (U. S. Food and Drug Administration 2013). Les vaccins basés sur la capsule Vi de Ty21a démontrent une efficacité de protection moindre, de 50 à 81%, s'étendant à trois ans et chutant rapidement par la suite. Ils nécessitent également la réfrigération pour leur distribution, de même qu'une injection parentérale (Fraser *et al.* 2007, U. S. Food and Drug Administration 2014). Aucun de ces vaccins n'a démontré d'efficacité à contrôler les éclosions de fièvre typhoïde d'origine courante (Center for Disease Control 1994). Un autre vaccin ayant démontré une efficacité intéressante (76-97%) est composé d'un conjugué toxoïde de l'exoprotéine A de *P. aeruginosa* et de la capsule Vi. Ce vaccin a des effets secondaires similaires aux deux premiers mais a encore besoin d'être conservé réfrigéré et, comme tous les autres vaccins contre *S. Typhi*, ne peut être administré aux jeunes enfants (Thiem *et al.* 2011). Un autre

vaccin utilisant les propriétés immunogéniques de protéines de la membrane externe (OmpC, OmpF et OmpA) est actuellement à l'étude chez la souris. La production d'anticorps spécifiques est fortement induite, mais l'utilisation de protéines dénaturées ne semble pas procurer d'immunité protectrice (Toobak *et al.* 2013). D'autres études seront nécessaires afin de déterminer le potentiel immunogénique protecteur de ces protéines. Jusqu'à présent, aucun des vaccins disponibles n'est facilement utilisable au sein des populations des régions endémiques.

Plusieurs méthodes diagnostiques ont été développées pour le dépistage des cas de fièvre typhoïde. La méthode standard de diagnostic consiste à prélever un échantillon de sang ou de moelle osseuse suivit de cultures microbiennes. Les deux avantages principaux de cette méthode est sa sélectivité inégalée et la possibilité de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de la souche. Cette méthode a cependant de nombreux inconvénients. Elle demande un accès à un laboratoire d'analyse, prend plusieurs jours à effectuer et sa sensibilité est relativement basse (40-60% pour le sang) en raison de la présence transitoire et peu nombreuse des bactéries dans ce site. Les prélèvements de moelle osseuse se révèlent généralement plus sensibles (autour de 80%) mais invasifs, douloureux et exposent le patient à des risques supplémentaires (Parry *et al.* 2011). La combinaison de cultures de sang, fèces, moelle osseuse et frottis rectal procure une sensibilité combinée de 98%, démontrant la robustesse de cette méthode malgré ses inconvénients (Hoffman *et al.* 1984).

Les tests sérologiques ont les avantages d'être utilisables rapidement et avec peu ou sans équipement élaborés. Historiquement, le test élaboré par Georges-Fernand Widal met en évidence l'agglutination d'une suspension bactérienne de *S. Typhi* ou de *S. Paratyphi* causée par le sérum du patient à tester. Ce test est cependant peu fiable en raison de la réactivité croisée avec d'autres pathogènes souvent rencontrés dans les mêmes régions (autres sérovars de salmonelles ou malaria principalement). Il ne permet pas non plus la caractérisation de la susceptibilité de la souche aux antibiotiques (Zorgani et Ziglam 2014). Malgré la facilité à effectuer le test de Widal, d'autres alternatives ont donc dû être développées. Toute une panoplie d'anticorps monoclonaux, la plupart dirigés contre la capsule Vi, le lipopolysaccharide O9 ou l'antigène flagellaire Hd, permettent une sensibilité appréciable mais leur spécificité est souvent discutable, selon les pathogènes antigéniquement apparentés

dans les régions dans lesquelles les tests sont effectués. Certains des tests sérologiques ont été adaptés pour accommoder des échantillons nécessitant peu de préparation afin d'être utilisés sur le terrain. Cet avantage à part, ils souffrent sommairement des mêmes limitations que les autres tests sérologique (Parry *et al.* 2011). Ces tests de première ligne sont essentiels au traitement des patients des régions endémiques où l'accès aux meilleurs soins médicaux disponibles est limitée ou inexistante.

Afin d'augmenter la spécificité discutable des techniques mentionnées plus tôt, les techniques d'amplification de séquences de nucléotides à partir de divers échantillons biologiques ont été élaborés et permettent d'obtenir une spécificité de 100%. Les *PCR* sont également des tests rapides à effectuer. Cependant, la nature transitoire de la présence des ST dans les sites de prélèvement limite une fois de plus la sensibilité de ces tests, variant de 38% à près de 100% selon les études (Nizami *et al.* 2006, Nga *et al.* 2010). Le raffinement des techniques par *PCR* par un meilleur choix de cible, *fliC* et plus récemment *iroB*, ainsi que par l'enrichissement d'échantillon de sang avec une courte période de pré-culture a démontré une sensibilité et une spécificité de respectivement 97% et 93% (Ganesan *et al.* 2014). Il reste difficile d'extrapoler les résultats auxquels on pourrait s'attendre lors de dépistages à grande échelle et dans des populations différentes sans d'autres études complémentaires. Il serait surprenant que la sensibilité dépasse celle de la culture directe des microorganismes mais elle est néanmoins largement plus rapide (Parry *et al.* 2011). L'amplification isothermale de séquences d'ADN facilitée par boucle offre un outil ne nécessitant pas de thermocycleur et requiert un équipement de laboratoire limité, ce qui a le potentiel de faciliter le diagnostic dans les pays en développement (Ravan et Yazdanparast 2013). Finalement, une technique expérimentale d'identification basée sur la spectrométrie de masse est en mesure de discerner les différents sérovars en peu de temps, mais n'est pas actuellement employée sur une base clinique, tant en raison d'un manque de standardisation que par le coût engendré par l'équipement (McFarland *et al.* 2014).

Un bémol important est à mentionner pour toutes les techniques actuelles puisque la détection de la présence du microorganisme pathogène ne signifie pas directement que la pathologie observée y soit associée, puisque la proportion de porteurs de *S. Typhi* ou *Paratyphi* peut s'élever à une proportion non négligeable (17% rapporté) sans que des symptômes cliniques

soient apparents (Pratap *et al.* 2014) ce qui rend difficile le choix de traitement lors d'un cas clinique, comme expliqué dans la section traitant de la pathogenèse.

Filaments extracellulaires de type fimbriae et pili

De nombreux facteurs de virulence ont été identifiés chez les salmonelles. Nous nous attarderons uniquement aux fimbriae dans le cadre de cette étude. L'étude des fimbriae ont débuté seulement suite au développement des techniques de microscopie électronique permettant l'observation directe de bactéries à haute résolution au tournant des années 1950 chez *E. coli* (Anderson 1949, Houwink et Iterson 1950). À cette époque, la microscopie électronique était considérée comme l'unique outil permettant la caractérisation des fimbriae (Figure 7).

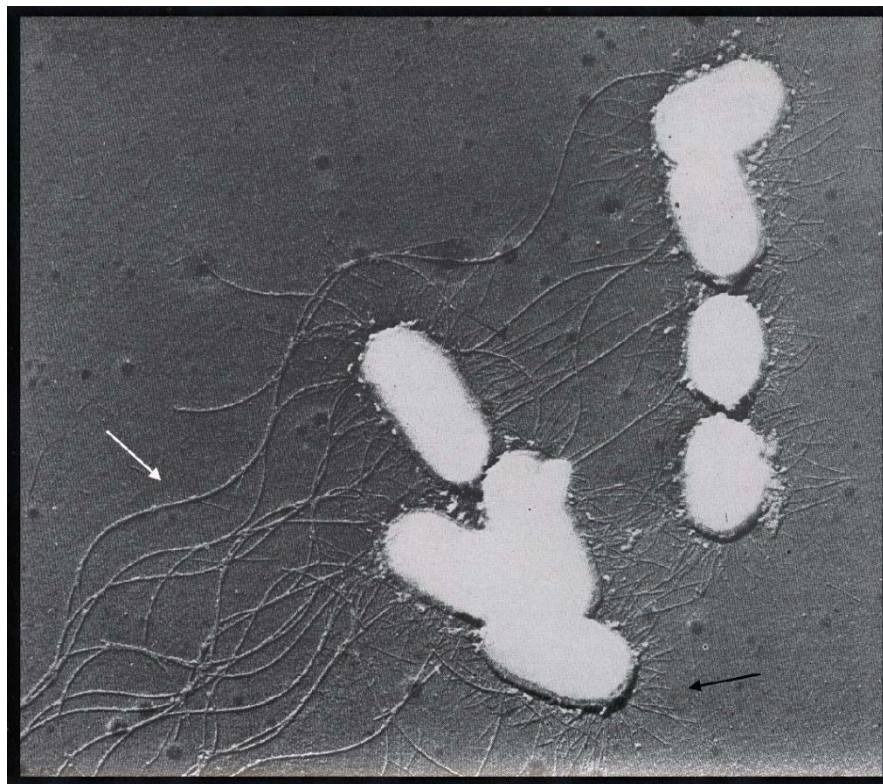


Figure 7 : Première observation directe de la présence de fimbriae chez *E. coli*

Première observation directe du fimbriae de type I (flèche noire) chez *E. coli* de structure distincte aux flagelles (flèche blanche). Adapté de Houwink et Iterson 1950 avec permission.

Encore aujourd'hui, il s'agit de la seule manière d'observer directement des structures si fines, permettant même d'observer l'extrémité d'un fimbriae au point d'en distinguer l'embout adhésif (Figure 8A). Les techniques de microscopie électronique permettent également de visualiser l'interaction des bactéries avec une matrice solide, comme par exemple la formation de biofilms sur des calculs rénaux (Figure 8B).

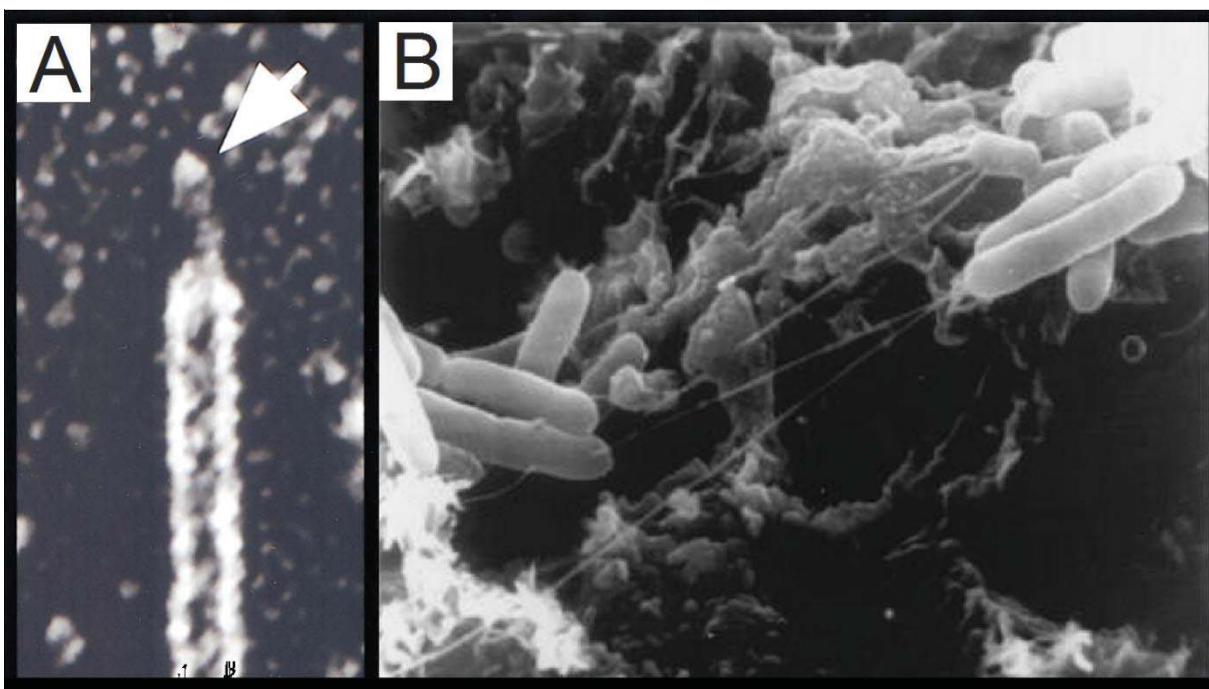


Figure 8 : Observation directe des fimbriae par microscopie électronique.

A) Observation de l'adhésine à l'extrémité d'un fimbriae de type I chez *E. coli* qui démontre sa structure composite. Adapté de (Schilling *et al.* 2001) B) Culture de *S. Typhimurium* en présence de calculs biliaires. On observe des structures filamenteuses rattachant les bactéries aux fragments de calculs biliaires adapté de (Prouty *et al.* 2002).

De nombreuses observations ont confirmé la présence de ces longs filaments extracellulaires chez d'autres genres d'entérobactéries, telles *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* et *Yersinia* (Duguid 1959, Coetzee et Pernet 1962, Vassiliadis *et al.* 1966, Duguid et Campbell 1969, Baturo *et al.* 1971, Galyov *et al.* 1991). Les entérobactéries ne sont pas les seules à posséder des fimbriae. En effet, divers groupes de recherche ont observé ces structures chez d'autres groupes de bactéries Gram-négatives telles *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Porphyromonas gingivalis* et *Pseudomonas aeruginosa* (Stull *et al.* 1984, Steven *et al.* 1986, Vallet *et al.* 2001, Nadkarni *et al.* 2014). Des structures similaires au

niveau fonctionnel mais possédant une structure sensiblement différentes sont également présentes chez de nombreuses bactéries Gram-positives telles *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Actinomyces naeslundii* ainsi que plusieurs espèces de *Streptococcus* (Hendrickx *et al.* 2011).

Pour les décrire, le terme *pili* est largement répandu dans la littérature, même s'ils sont différents de leur contrepartie chez les bactéries Gram-négatives (Danne et Dramsi 2012). Bien que de nombreuses autres adhésines non-fimbriaires aient été décrites, il semble que ces longues projection extracellulaires jouent des rôles particuliers et avantageux à une panoplie de bactéries colonisant divers tissus, chez les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les nématodes, ou même les plantes (Korhonen *et al.* 1983, Snyder *et al.* 2011, Kudirkiene *et al.* 2014). La structure spatiale des protéines des fimbriae de type I a été déterminée des années plus tard permettant de mieux modéliser la surface d'interaction entre les récepteurs cibles et l'adhésine et a contribué au design d'inhibiteurs d'adhésion (Hahn *et al.* 2002, Pinkner *et al.* 2006). Ce n'est qu'au début des années 1980 que les gènes codant pour un fimbria de type I furent identifiés puis leur organisation génétique décortiquée chez une souche uropathogénique d'*E. coli* (Hull *et al.* 1981, Clegg et Pierce 1983, Freitag et Eisenstein 1983). Les premiers séquençages des gènes responsables de la biosynthèse des fimbriae de type I chez plusieurs souches d'*E. coli* ont démontré une homologie remarquable, malgré une absence de déterminants antigéniques ou de spécificité de ligands communs (Klemm 1981, 1982, Baga *et al.* 1984, Klemm 1984). La classification actuelle des fimbriae est basée sur ces trois caractéristiques, soient leur structure tridimensionnelle, leur spécificité de ligands ainsi que leur phylogénie basée sur l'homologie de séquence (Nuccio et Baumler 2007, Fronzes *et al.* 2008). Plusieurs familles de filaments extracellulaires ont été décrits à ce jour : les pili de conjugaison (F) (Lawley *et al.* 2003), les pili de type IV généralement associés à la sécrétion de toxines ou encore rapportés comme inducteur de *twitching motility* (Burrows 2012, Melville et Craig 2013), les fimbriae assemblés à l'aide d'un mécanisme de nucléation/précipitation souvent appelés *curli* (Evans et Chapman 2014) et finalement les Fimbriae assemblés à l'aide de Chaperones périplasmiques et d'un Placier membranaire (FCP) (Geibel et Waksman 2014). Cette dernière famille contient les fimbriae de type I à l'étude depuis les années 1950 et regroupe de loin le plus grand nombre de membres connus et leurs

rôles et synthèses sont mieux documentés à l'heure actuelle. La dernière analyse systématique des FCP recensait 189 systèmes différents sur la base du placier (seule protéine unique voir section sur la structure et l'assemblage des FCP) qui ont été classés en 6 clades (α , β , γ , κ , π et σ) subdivisés en plusieurs sous-clades (Nuccio et Baumlér 2007). Cependant, cette analyse ne tient pas compte des très nombreux projets de séquençage et aurait besoin d'être mise à jour. En recherchant le même motif protéique unique et conservé chez les placiers des FCP que dans cette dernière étude (PFAM00577), le recensement actuel dénombre plus de 12000 séquences. Elles sont principalement retrouvées chez les γ -protéobactéries dont plus de 11 000 séquences chez les entérobactéries ainsi que chez les pseudomonadales, xanthomonadales, pasteurallales, aeromonales, vibriomonales et également au sein des β -protéobactéries (près de 700 séquences) et de quelques-unes chez les α -protéobactéries (14 séquences) (Marchler-Bauer *et al.* 2015). La distribution de ces séquences est potentiellement biaisée par les intérêts de recherche des projets de séquençage effectués et il est fort possible que l'on retrouve un grand nombre de FCP dans des groupes de bactéries jusqu'à présent peu étudiés en ce sens, mais il est évident que les fimbriae sont des structures possédant un large éventail de fonctions essentielles et/ou conférant un avantage adaptatif majeur au cours de l'évolution des espèces bactériennes.

En s'attardant uniquement aux salmonelles, il est possible de dresser un portrait évolutif des différents sérovars par rapport à l'acquisition ou la perte des FCP. Au moins 35 différents fimbriae ont été séquencés chez les salmonelles, tous sérovars confondus. Ils ont été distribués en cinq clades en fonction de leur homologie de séquence (Figure 9). Les douze FCP retrouvés chez *S. Typhi* se retrouvent quant à eux dans les clades α (*tcf*), π (*std*, *ste*), et γ (*stc*, *sta*, *stb*, *saf*, *sef*, *bcf*, *fim*, *stg*, *sth*). Cet arbre phylogénique permet d'apprécier la diversité retrouvée chez les FCP.

Un haut niveau de variations alléliques, particulièrement au niveau de l'adhésine du fimbria de type I (*fimH*) ainsi que de nombreux événements d'acquisition et de perte d'autres FCP suggèrent que ces structures jouent un rôle évolutif majeur pour l'adaptation des salmonelles chez une panoplie impressionnante d'hôtes (Yue *et al.* 2012).

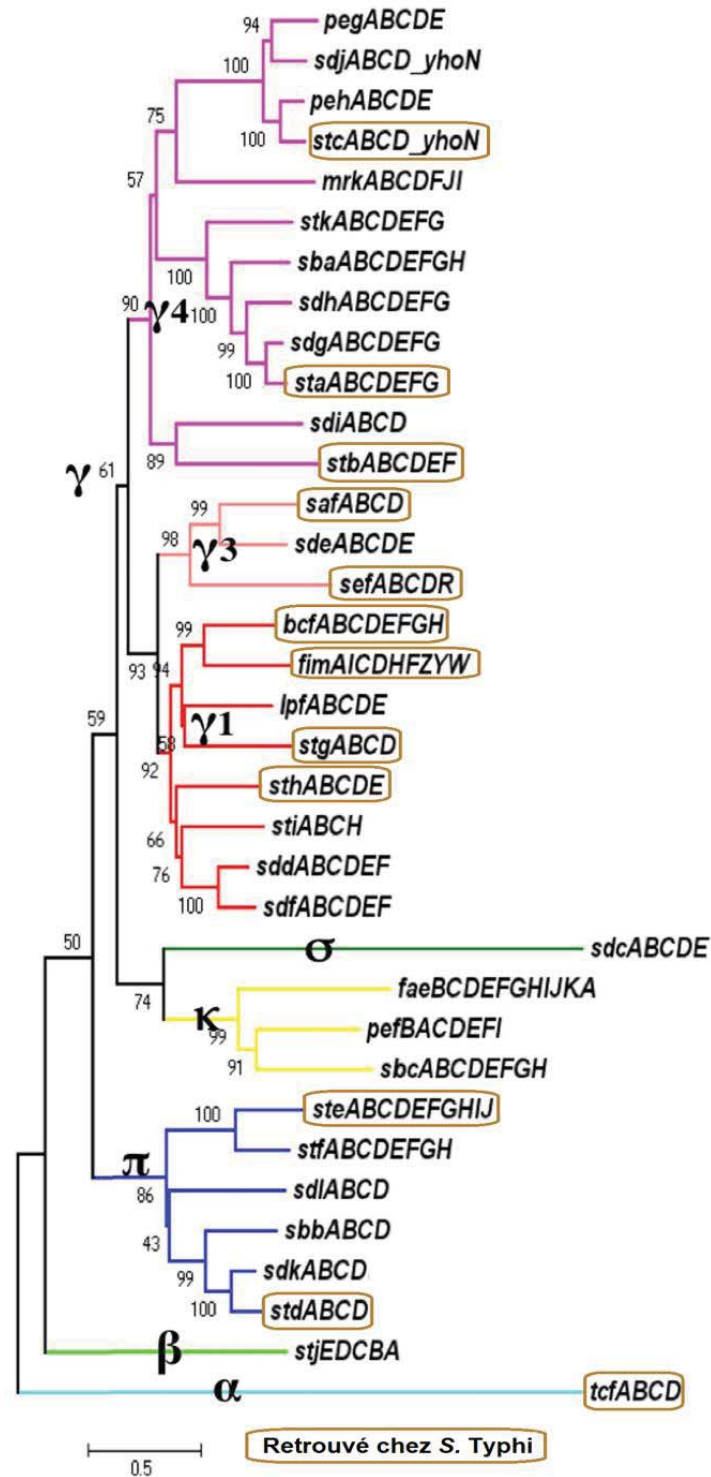


Figure 9 : Arbre phylogénique des 35 types de FCP retrouvés chez les salmonelles.

Cet arbre a été généré à partir de 950 protéines de type placier retrouvés chez 90 génomes. Les chiffres aux embranchements représentent le pourcentage d'homologie de séquence. L'échelle représente le nombre de substitutions par acide aminé. Les FCP encadrés en brun sont retrouvés chez *S. Typhi*. Adapté de (Yue *et al.* 2012).

Rôles des fimbriae

La capacité d'adhésion à différents récepteurs a été associée aux fimbriae et constitue leur fonction la plus connue. La première observation fonctionnelle des fimbriae a été faite chez *E. coli* et consistait à l'hémagglutination d'érythrocytes (Duguid *et al.* 1955). Cette étude a également documenté l'inhibition de l'hémagglutination par le D-mannose de certains des fimbriae (actuellement classés de type I). Cet inhibiteur fonctionne par compétition avec les récepteurs mannosylés, mais était incapable d'inhiber l'hémagglutination causée par d'autres fimbriae. Ce fut le premier indice suggérant que les ligands des fimbriae étaient divers. Il se trouve que le ligand de l'adhésine de ce fimbriae est un résidu glycosylé de divers épithéliums retrouvé chez plusieurs espèces animales (Sathyamoorthy *et al.* 1991, Xie *et al.* 2006). Dans cet exemple, FimH a été identifié comme l'adhésine du fimbria de type I d'*E. coli* et s'attache à certains récepteurs cellulaires glycosylés avec un motif Man₆GlcNAc₂ et Man₉GlcNAc₂ (Firon *et al.* 1983). Un autre exemple est l'adhésine PapG d'*E. coli* liant les Gal α -1,4-Gal β des glycosphingolipides des cellules épithéliales rénales (Stromberg *et al.* 1990). La flexibilité mécanique de ce fimbria a été évaluée afin de mieux comprendre comment ces bactéries résistaient au flot urinaire de cet environnement. La structure de Pap peut s'étirer de 6 à 9 fois sa longueur avant de se rompre, démontrant à quel point cette structure peut être flexible et permettre une adhésion stable malgré un stress mécanique (Jass *et al.* 2004). Cette étude ainsi que d'autres ont démontré que l'attachement aux tissus de l'hôte constitue une étape essentielle dans la pathogenèse de nombreuses bactéries (Pratt et Kolter 1998, Nielubowicz et Mobley 2010, Watts *et al.* 2012).

Les fimbriae discutés ci-haut font partis des FCP. Ces derniers constituent le groupe le plus diversifié de structures filamenteuses non flagellaires connu à ce jour, loin en avant des curli ou des pili de type IV. La majeure partie des connaissances sur les FCP est dérivée des études effectuées sur *fim* et *pap* faisant parti des clades γ et π respectivement (Busch et Waksman 2012). Bien qu'ils partagent le même mécanisme d'assemblage, l'adhésine de chaque FCP est unique. Différents ligands ont été identifiés pour toute une variété d'adhésines fimbriaires et des techniques de criblage *in vitro* de ces cibles ont été élaborées pour faciliter leur découverte et ont entre autre été utilisées pour étudier plusieurs adhésines chez les entérobactéries (Day *et*

al. 2009, Wurpel *et al.* 2014). Les ligands sont habituellement des protéines possédant un patron de glycosylation bien particulier conférant leur spécificité (Krogfelt *et al.* 1990, Kuehn *et al.* 1992). De plus, il a été constaté que les fimbriae ne sont pas tous exprimés au même moment et possèdent des affinités pour plusieurs récepteurs distincts pouvant être rencontrés au cours d'une infection (Felek *et al.* 2011, Korea *et al.* 2011).

Le répertoire de fimbriae chez une souche bactérienne se compose dans la plupart des cas de plusieurs membres de la famille des FCP. De nombreux fimbriae putatifs sont annotés dans les banques de données de séquençage par leur homologie aux systèmes connus mais pour la plupart, aucune étude fonctionnelle n'a été publiée. La plus grande partie de ces fimbriae putatifs sont présents chez les entérobactéries qui, par définition, colonisent le tractus gastro-intestinal. Par exemple, le génome d'*E. coli* contiendrait jusqu'à 12 FCP, celui de *P. mirabilis* jusqu'à 17 et celui de *S. enterica* jusqu'à 15 (*S. Typhi* en contiendrait 14 dont 12 de type FCP) (Welch *et al.* 2002, Gong *et al.* 2014, Kuan *et al.* 2014). Plusieurs de ces fimbriae putatifs auraient été acquis par transferts de gènes horizontaux, phénomène fréquent dans l'environnement intestinal et constitue un mécanisme majeur d'acquisition de nouvelles fonctions (Salysers 1993, Aminov 2011). Par exemple, chez *S. Typhimurium*, Lpf (*long-polar fimbriae*) a été parmi les premiers fimbriae découverts. La mutation de *lpfA*, la sous-unité majeure composant le filament, réduit la capacité d'adhésion spécifique aux cellules M et aux plaques de Peyer (Baumler *et al.* 1996). Deux homologues à ce système fimbriaire ont été découverts par la suite dans un ilot de pathogénicité absent d'une souche non pathogénique d'*E. coli* K-12 mais présent chez une souche entéro-hémorragique O157:H et ont été nommés Lpf1 et Lpf2 (Hayashi *et al.* 2001). Ces fimbriae expliquent donc, du moins en partie, la capacité de ces souches à coloniser le tractus intestinal. Ils ne sont cependant pas les seuls à avoir été associés à ce rôle. Toujours chez *S. Typhimurium*, la mutation de *fimA*, la sous-unité majeure constituant le fimbria de type I, réduit la capacité de colonisation de l'intestin chez le porc (Althouse *et al.* 2003). De plus, les fimbriae *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std* et *sth* ont été associés à la persistance intestinale chez un modèle murin (Weening *et al.* 2005). Bien que seule l'expression de *fim* soit détectée chez *S. Typhimurium* lorsque cultivé en milieu LB, l'expression des fimbriae *bcf*, *fim*, *lpf*, *pef*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, et *sti* est détectée après culture dans des segments d'intestins de boeuf ligaturés (Humphries *et al.* 2003). Ces observations vont

dans le sens d'une diversité fonctionnelle importante des fimbriae pour une même espèce afin de coloniser différents tissus ou animaux.

Le rôle des fimbriae va plus loin encore. Chez *E. coli*, il a été démontré que le fimbria Pap est un composant essentiel pour l'invasion de cellules épithéliales (Martinez *et al.* 2000). De manière similaire, chez *N. meningitidis*, le réarrangement du cytoplasme des cellules épithéliales vasculaires a été associé à l'expression de *pilV* et *pilX*, deux composants d'un fimbria classé comme pili de type IV. Chez *Porphyromonas gingivalis*, deux fimbriae (nommés mineur et majeur) jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte. Lorsque mis en contact avec des cellules dendritiques en culture, un mutant du fimbria majeur induit une faible expression de cytokines pro-inflammatoires et n'induit pas une maturation efficace de la cellule hôte comparé à la souche sauvage (Zeituni *et al.* 2009). L'inflammation locale induite par cette bactérie contribuerait à sa pathogenèse plutôt que de constituer une réponse efficace de l'hôte (Tonetti *et al.* 1994, Huang *et al.* 1998, Asai *et al.* 2001). Chez la souris, *S. Typhimurium* provoque également une forte inflammation au niveau intestinal via l'expression de curli (encodés par *csgBAC*) qui est reconnu par plusieurs récepteurs TLR à la surface des macrophages (Zhan *et al.* 2015). L'activation de cette réponse inflammatoire est nécessaire à l'expression intracellulaire des gènes de SPI-2, un îlot de pathogénicité essentiel à la survie et à la multiplication de ce sérovar dans les macrophages (Arpaia *et al.* 2011, Meya *et al.* 2014). Ces observations suggèrent que les fimbriae sont responsable de moduler la réponse de l'hôte en faveur des bactéries, en plus d'accomplir un rôle d'adhésion strict.

Un autre rôle associé aux fimbriae est l'initiation de la formation de biofilms. Chez *S. Typhimurium*, le régulateur *csgD* est impliqué dans la formation de biofilms. Lorsque cultivé en gélose, les colonies exprimant l'opéron *csg* sont d'apparence sèche, rouge et rugueuse et possèdent une forte teneur en cellulose. Les fonctions du régulateur *csgD* sont multiples et sont discutées plus amplement dans la section concernant la régulation des fimbriae mais comprennent entre autre la régulation de l'expression des autres gènes de l'opéron *csg*. L'expression de *csgBAC* donne naissance à des courts filaments possédant une capacité auto-agrégative, ce qui permet aux bactéries de former des micro-colonies ou d'échafauder le reste des composantes nécessaires à un biofilm mature (Gerstel et Romling 2003, Romling 2005). Bien que les curli soient reconnus chez plusieurs espèces pour contribuer à la formation de

biofilms, certains FCP ont aussi été associés à ce phénotype. Encore chez *S. Typhimurium*, les mutants *lpfABCDE* et *pefC* démontrent également des défauts de formation de biofilm lorsque mis en contact avec une lignée de cellule épithéliale humaines (HEp-2) *in vitro* (Ledebøer *et al.* 2006).

Très peu est connu sur l'expression ou la fonction des fimbriae retrouvés chez *S. Typhi*. Le curli encodé par *csgBAC* et *csgDEFG* est retrouvé dans le génome, ainsi que l'opéron *pil* codant pour un système de pili de type IV. Les douze autres opérons putatifs de fimbriae suivants font partie des FCP : *bcf*, *fim*, *saf*, *sef*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste*, *stg*, *sth* et *tcf*. Bien que plusieurs des fimbriae encodés chez *S. Typhi* soient également retrouvés chez d'autres sérovars de *S. enterica*, les opérons codants pour les fimbriae *bcf*, *fim*, *sef*, *ste*, *stg* et *sth* sont potentiellement inactivés par des pseudogènes (Townsend *et al.* 2001). Une étude a identifié des anticorps ciblant les protéines TcfB, StbD ainsi que trois protéines de l'opéron *csg*, tous des éléments faisant parti de l'arsenal de fimbriae de cette espèce (Harris *et al.* 2006). Une autre étude n'a pas observé de défaut d'adhésion sur un modèle de cellules épithéliales intestinales (INT-407) chez les mutants *staA* ou *tcfA* (Bishop *et al.* 2008). Une étude précédente de notre laboratoire a mis en évidence des défaut d'adhésion et/ou d'invasion lors de l'interaction des mutants *csg*, *fim*, *pil*, *sef*, *std*, *ste*, *stg*, *sth* et *tcf* de *S. Typhi* avec des cellules épithéliales (INT-407) (David 2012). Une autre étude précédente publiée dans notre laboratoire a utilisé une banque d'approximativement 10^5 mutants par insertion d'un transposon dans un essai compétitif pour être phagocytés par des macrophages humains (THP-1). En comparant l'ADN récupéré après les tests de phagocytose compétitifs avec la banque de départ, 130 gènes ont été ciblés comme potentiellement impliqués dans l'adhésion et l'internalisation par les phagocytes (Sabbagh *et al.* 2012). Parmi ces gènes, *bcf*, *csg*, *stb* et *stc* ont été identifiés puis confirmés en fabriquant les mutants individuels démontrant leur importance. Il est tout de même surprenant qu'une mutation dans l'opéron *bcf* ait eu un impact, puisqu'il est considéré comme étant non fonctionnel à cause d'un pseudogène (Townsend *et al.* 2001). Ces fragments d'information suggèrent que certains fimbriae de *S. Typhi* jouent un rôle lors de la pathogenèse. Des études sur les fimbriae de ce sérovar sont nécessaires pour déterminer leurs rôles et leurs conditions d'expression.

Structure et assemblage des fimbriae de type chaperon-placier

Bien que plusieurs types de fimbriae aient été décrits, nous nous limiterons dans le cadre de cette étude à la structure et à l'assemblage des FCP. Les FCP sont des structures extracellulaires pouvant varier en dimensions mais possédant une architecture similaire. Certains sont très fins, mesurant approximativement 2 nm de diamètre et quelques dizaines de nanomètres de longueur (pili F1 chez *Y. pestis*), alors que d'autres atteignent un diamètre de 6-8 nm et peuvent atteindre plus d'un micromètre de longueur lorsque observé sur des bactéries fixées (Jones *et al.* 1995, Hahn *et al.* 2002, Zavialov *et al.* 2003, Mu et Bullitt 2006). Il a cependant été démontré que ces structures sont flexibles et peuvent s'étirer de 5 à 7 fois leur taille au repos lorsqu'un stress mécanique est imposé (Jass *et al.* 2004).

Les FCP sont composés de plusieurs sous-unités protéiques différentes organisées en trois portions distinctes : un site d'assemblage transmembranaire, un corps filamenteux et un embout. Pour assembler un tel fimbria, au moins trois protéines ont été identifiées comme essentielles: un chaperon, une sous-unité majeure ainsi qu'un placier (Geibel et Waksman 2014). Parfois, d'autres protéines accessoires composent le filament, tel une sous-unité terminale proximale ou encore un adaptateur entre l'adhésine de l'embout et la dernière sous-unité majeure composant le corps du filament (Zeiner *et al.* 2012). Les différentes protéines structurales et nécessaires à l'assemblage d'un FCP sont illustrées dans la figure 10. Les différentes composantes sont d'abord exportées à travers la membrane interne jusqu'au périplasme sous forme de polypeptides non repliés à l'aide de la machinerie Sec (Stathopoulos *et al.* 2000). Cette machinerie est responsable du transport d'une grande partie des protéines bactériennes se retrouvant à un moment ou à un autre dans le périplasme. Sommairement, la chaperone cytoplasmique SecB reconnaît un peptide signal des différentes composantes du fimbria et prévient leur repliement prématuré. Ce complexe sera reconnu par SecA, une enzyme hydrolysant l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire à la translocation du polypeptide vers le périplasme lors de l'interaction du complexe SecA/SecB/polypeptide avec le complexe SecYEG ancré dans la membrane interne (Solov'eva *et al.* 2012).

Une fois que les différents polypeptides atteignent le périplasma, c'est d'abord le placier qui sera replié par des chaperons tels SurA, Skp et DegA, qui guideront également son insertion jusqu'au complexe BAM (*β -barrel assembly machinery*).

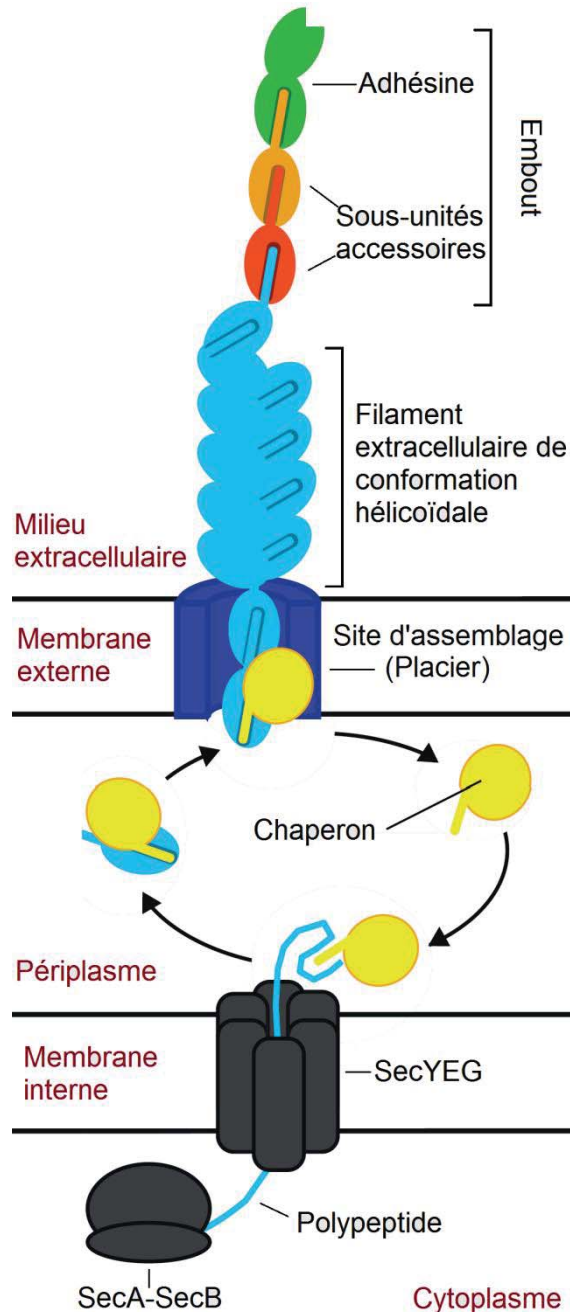


Figure 10 : Structure et assemblage d'un fimbria de type chaperon-placier.

Les différents compartiments sont écrits en rouge. Les trois portions générales du filament sont l'embout, le filament et le site d'assemblage constitué du placier. Adapté de (Allen *et al.* 2012).

Le complexe BAM comprend de nombreuses protéines formant un pore membranaire (dont BamA/Omp85) et permet le recrutement et l'insertion de protéines à la membrane externe (Palomino *et al.* 2011, Solov'eva *et al.* 2012).

Le placier constitue la plateforme d'assemblage du fimbria. Cependant, les différentes sous-unités composant le corps et l'embout du filament doivent d'abord être correctement repliées. C'est ici qu'interviennent les chaperons encodés dans les opérons des fimbriae. Ces derniers sont en mesure d'assurer leur propre repliement en plus de distinguer les sous-unités du filament dont les ponts disulfures ont été correctement appariés, ce qui améliore l'efficacité de l'assemblage du filament (Vetsch *et al.* 2004, Crespo *et al.* 2012). Les chaperons sont également responsable de stabiliser la structure des sous-

unités composant le filament à leur entrée dans le périplasma à l'aide d'un mécanisme appelé *donor-strand complementation*, ce qui empêche également leur polymérisation prématurée (Puorger *et al.* 2011, Di Yu *et al.* 2012). Seules les complexes sous-unité/chaperon peuvent

être reconnues puis assemblées les unes à la suite des autres par le placier. Les chaperons jouent également un rôle au niveau de cet assemblage selon un mécanisme appelé *donor-strand exchange*. Sommairement, l'extrémité N-terminale de la nouvelle sous-unité coulisse dans une poche de la sous-unité précédente, ce qui libère le chaperon dans le périplasme (Remaut *et al.* 2006, Rose *et al.* 2008). L'ordre dans lequel les sous-unités sont assemblées est contrôlé par l'affinité respective de chaque complexe sous-unité/chaperon avec le placier ainsi que par la concentration de ces mêmes sous-unités dans le périplasme. En conditions normales, l'ordre de l'assemblage s'effectue à partir de l'embout (l'adhésine) jusqu'à la base de la tige (sous-unités majeure) (Allen *et al.* 2013).

Il n'est pas encore clair par quel mécanisme la terminaison de l'élongation est établie chez les FCP étudiés structurellement, à l'exception de Pap, dans lequel une sous-unité particulière (PapH) est incorporée et ne possède pas de poche pour accueillir la sous-unité suivante, menant à la terminaison de la polymérisation (Baga *et al.* 1987, Verger *et al.* 2006). L'énergie nécessaire à la translocation des sous-unités vers le milieu extérieur serait issue de la libération de ces dernières du placier suite au *donor-strand exchange* et de la force exercée par l'enroulement du filament dans le milieu extracellulaire (Busch *et al.* 2015). Une fois assemblé, le corps du filament est composé de centaines voire de milliers de copies d'une sous-unité majeure prenant une conformation de longue hélice (Hahn *et al.* 2002, Mu et Bullitt 2006).

Des inhibiteurs chimiques ciblant différentes étapes de la biogenèse des fimbriae existent mais sont encore au stade de développement (Pinkner *et al.* 2006, Klein *et al.* 2010, Chorell *et al.* 2012, Lo *et al.* 2014). Ces stratégies sont discutées plus amplement dans la section discutant des traitements potentiels contre *S. Typhi*. Nul doute que l'accumulation de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'assemblage des fimbriae permettra de suggérer de nouvelles approches pour prévenir ou guérir les infections bactériennes dont la pathogenèse repose sur leur attachement aux cellules de l'hôte.

Expression des fimbriae

Afin d'étudier les fimbriae, il est intéressant de connaître dans quelles conditions ils sont exprimés. Chez *S. Typhimurium*, seuls deux fimbriae sont exprimés dans des conditions standard de laboratoire : le fimbria de type I encodé par l'opéron *fim* et le curli encodé par l'opéron *csg* (Humphries *et al.* 2003, Yoo *et al.* 2013). L'expression de *fim* est maximal en milieu liquide pendant la phase de croissance stationnaire et est défavorisée en croissance logarithmique ainsi que par l'utilisation du glucose comme source d'énergie ou encore par la culture sur milieu solide (Duguid et Campbell 1969, Tinker et Clegg 2000). Pour *csg*, l'expression est également maximale en phase stationnaire, et aussi favorisée par un milieu pauvre en nutriments, par une faible osmolarité ainsi que par une faible température (28°C)(Gerstel et Romling 2003). L'expression de l'opéron *csg* est également favorisée suite à l'adhésion des bactéries à certaines surfaces abiotiques tels des plastiques ou matériaux différents (De Oliveira *et al.* 2014).

L'expression des autres fimbriae de *S. Typhimurium* a été observée dans des segments ligaturés d'iléum bovin, ce qui démontre que leur expression est néanmoins possible lorsque les bonnes conditions sont réunies (Humphries *et al.* 2003). Des études d'expression par *PCR* effectuées dans notre laboratoire ont permis d'observer l'expression de plusieurs opérons fimbriaires chez *S. Typhi* (David 2012). Les opérons *pil*, *fim*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste* et *tcf* sont exprimés en milieu LB supplémenté à 0.3M de NaCl, ce qui suggère qu'une augmentation de pression osmotique contribue à leur expression. En milieu minimal sans fer (M63), seule l'expression de l'opéron *sta* a été observée, alors que le milieu supplémenté en fer permet en plus l'expression des opérons *fim*, *pil* et *stb*. Ceci suggère que la présence de fer dans le milieu peut favoriser l'expression de certains fimbriae chez *S. Typhi* (David 2012). D'autres études doivent être entreprises, par exemple à l'aide de mutants de régulateurs, afin de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents permettant la régulation de l'expression des fimbriae.

Mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des fimbriae

Au niveau moléculaire, l'expression des fimbriae est contrôlée par plusieurs mécanismes distincts. Certains de ces mécanismes font appel à des facteurs de transcription seulement actifs ou exprimés dans des conditions particulières. Parfois, l'expression des fimbriae est également régulée par des modifications post-traductionnelle ou encore par des modifications de la structure de l'ADN.

Un mécanisme de régulation par modification de l'ADN est d'ailleurs illustré dans la régulation de l'opéron *fim* chez *E. coli*. Cet opéron a été parmi le premier à avoir fait l'objet d'études. Les premières observations microscopiques ont permis d'observer que les bactéries issues d'une seule culture pure expriment parfois le fimbria de type I et parfois non (Duguid *et al.* 1955). Cette variabilité phénotypique au sein d'une population est appelée «variation de phase». Chez *E. coli*, la variation de phase de l'opéron *fim* est contrôlée par un interrupteur d'ADN (Abraham *et al.* 1985). En amont de l'opéron *fim*, un segment de 314 paires de bases nommé *fimS* peut être inversé. Cette inversion est catalysée par deux tyrosine recombinases spécifiques qui reconnaissent les sites flanquant *fimS* et sont encodées par les gènes *fimE* et *fimB*. Ceci a pour effet de déplacer le promoteur dans une position empêchant l'expression des protéines structurales de ce fimbria (McCusker *et al.* 2008). Il a été démontré que FimE est responsable de l'inversion bidirectionnelle de l'élément, alors que FimB est pour sa part responsable de la répression de l'opéron *fim* (Blomfield *et al.* 1991). L'expression de la gyrase (*gyrA* et *gyrB* chez *E. coli* K-12) joue également un rôle dans l'inversion de *fimS* puisque son activité enzymatique est nécessaire à proximité de cet élément (Dove et Dorman 1994). Les facteurs déterminant le rythme d'inversion de l'élément *fimS* dépendrait du ratio [ATP]/[ADP] variant selon la phase de croissance et la disponibilité en nutriments (Dorman et Corcoran 2009). L'opéron *fim* chez les salmonelles n'est cependant pas régulé par un élément d'ADN inversible et a été acquis indépendamment d'*E. coli*. Par contre, deux différentes adhésines fimbriaires (*pilV* et *pilV'*) encodées par l'opéron *pil* sont régulés par un interrupteur d'ADN de manière similaire qui permet l'expression de l'un ou l'autre des allèles (Zhang *et al.* 1997, Morris *et al.* 2003, Nuccio et Baumler 2007). D'autres fimbriae chez les salmonelles pourraient cependant être soumis à une telle régulation.

L'avantage conféré par un mécanisme de variation de phase se traduit en une meilleure capacité d'évader les défenses du système immunitaire. En effet, les fimbriae sont des immunogènes importants conservés chez de nombreux sérovars. Par exemple, *long-polar fimbria* (*lpf*) est un fimbria exprimé chez plusieurs souches de salmonelles et est soumis à une variation de phase. On peut observer l'avantage conféré par une telle régulation dans un modèle de souris vaccinées par une souche de salmonelle exprimant *lpf*. Lorsque ces souris sont à nouveau infectées par une seconde souche de salmonelle qui possède aussi *lpf*, les bactéries n'exprimant pas ce fimbria au sein de la population démontrent un avantage à coloniser l'épithélium intestinal par rapport à celles qui l'expriment, signe que ces bactéries utilisent la variation de phase pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (Norris et Baumlér 1999).

La méthylation de séquences d'ADN au niveau d'un promoteur est un autre moyen d'affecter l'expression des fimbriae. Par exemple, l'expression du fimbria *std* chez *S. Typhimurium* est contrôlée par un tel mécanisme. La protéine Dam (*DNA adenine methylase*) est responsable de cette méthylation qui, dans ce cas, empêche l'expression de l'opéron *std*. Un mutant *dam*, incapable de réprimer *std*, possède un défaut d'infectivité chez la souris (Jakomin *et al.* 2008). Ceci est potentiellement dû à l'incapacité du répresseur RosE à s'attacher au promoteur de l'opéron *std* lorsqu'il n'est pas méthylé par Dam (Chessa *et al.* 2008).

D'autres facteurs de transcription sont connus pour influencer l'expression des fimbriae chez *S. Typhimurium*. Une mutation du système *rcsCBD* mène à une augmentation de l'expression des opérons *fim* et *std* (Wang *et al.* 2007). Les conditions exactes menant à l'activation de ce système ne sont pas entièrement décrites mais incluent la croissance en milieu solide, la présence de fer (chez un mutant *pmrA*) ainsi que la croissance à basse température (Ferrieres et Clarke 2003, Mouslim et Groisman 2003). Le régulateur *fur* (*ferric uptake regulator*) est également un candidat potentiel pour réguler plusieurs fimbriae chez *S. Typhimurium*, dont les opérons *bcf* et *fim* (Prajapat et Saini 2012). Ce régulateur joue généralement un rôle répresseur mais peut également être un activateur en fonction de ses cibles (Hantke 2001, Lee et Helmann 2007). Il est principalement sous le contrôle de la concentration intracellulaire de fer libre Fe^{2+} , elle-même dépendante de l'import de ces ions à partir du milieu extracellulaire (Troxell et Hassan 2013). Finalement, la plupart des opérons codant pour des fimbriae

contiennent leurs propres protéines régulatrices (McClelland *et al.* 2001, Townsend *et al.* 2001).

En raison de la capacité d'adhésion des fimbriae et de leur propension à favoriser la phase sessile de la vie bactérienne, il est intéressant de s'attarder à une molécule de signalisation particulière, le di-GMP cyclique. En effet, ce messenger est très répandu chez les bactéries et est reconnu pour promouvoir la transition entre la phase mobile et la phase sessile. La formation de biofilms est en étroite relation avec la concentration intracellulaire de ce messenger. L'initiation de la formation d'un biofilm est dépendante d'une adhésion initiale à une surface, bien souvent liée à l'expression de fimbriae (Zakikhany *et al.* 2010, Romero 2013, Dunger *et al.* 2014, Khanal *et al.* 2015). Au moins deux récepteurs de ce messenger ont été décrits chez *S. Typhimurium* (BcsA et YcgR) et sont également retrouvés chez *S. Typhi* (Altschul *et al.* 1990, Zorraquino *et al.* 2013).

Somme toute, les facteurs moléculaires qui influencent l'expression des différents fimbriae chez *S. Typhi* sont à ce jour incomplets. La plupart des informations disponibles sont des extrapolations issues d'études chez d'autres entérobactéries telles *E. coli* ou de *S. Typhimurium*. D'autres expériences doivent être effectuées afin de caractériser les conditions dans lesquelles ces facteurs de virulence potentiellement importants sont exprimés ainsi que les mécanismes de régulation sous-jacents.

Problématique et objectifs

Le contrôle épidémiologique de la fièvre typhoïde fait appel à deux axes principaux : la prévention par l'hygiène et le traitement des cas par une panoplie d'antibiotiques. Ces derniers sont graduellement moins efficaces et force est d'admettre que l'arsenal de médicaments dont on dispose sera insuffisant pour assurer la santé publique d'ici un avenir rapproché, d'abord dans les pays endémiques mais potentiellement ailleurs dans le monde. L'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre *S. Typhi* peut être soutenue par la découverte de nouvelles cibles pour le développement de vaccins, d'antibiotiques ou autres molécules antimicrobiennes. Les cibles intéressantes sont souvent des composants essentiels à la survie et la dissémination de la bactérie au cours de sa pathogenèse. Plusieurs études chez d'autres espèces bactériennes ont attribuées de tels rôles aux FCP mais la contribution de ces systèmes d'adhésion putatifs à la pathogenèse de *S. Typhi* est à l'heure actuelle inconnue.

L'étude de ces systèmes d'adhésion doit faire appel à une stratégie judicieuse car aucun modèle animal ne nous permet de reconstituer fidèlement l'interaction hôte-pathogène de cet organisme. Cependant, plusieurs approches sont susceptibles de procurer des informations pertinentes à ce sujet.

Le projet ci-présent suit deux lignes directrices. D'une part, l'activité des promoteurs des systèmes d'adhésion a été évaluée dans plusieurs conditions expérimentales de culture à l'aide de gènes rapporteurs afin de démontrer qu'ils sont bel et bien fonctionnels et répondent selon la disponibilité en nutriments, notamment du fer libre. D'autre part, le clonage des opérons entiers sous le contrôle d'un promoteur inductible a été entrepris. Ceci permet de forcer la surexpression de ces structures et d'évaluer leur contribution à la capacité d'adhésion de bactéries avec des cellules épithéliales intestinales humaines en culture *in vitro*. Dans son ensemble, cette étude cherche à démontrer que les systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi* sont exprimés et fonctionnels.

Matériel et méthodes

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture. Les souches bactériennes et plasmides utilisés sont décrits respectivement dans les tableaux I et II. Sauf lorsque indiqué, les souches ont été cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) liquide ou solide (supplémenté d'agar 1,5%) fourni par BioBasic. La composition du milieu M63 utilisé pour les expériences abordant le rôle du fer ainsi que la richesse du milieu est le suivant, avec et sans ajout de 100µM FeCl₃ : 40mM KH₂PO₄, 60mM K₂HPO₄, 15mM (NH₄)₂SO₄, 33mM D-glucose, 0,1% caséine hydrolysée dont le fer a été chélaté, 100µM MgSO₄, 40µg/mL tryptophane, 40µg/mL cystéine et ajusté à pH 7.5 avec du KOH. Pour maintenir les plasmides chez les souches, ces milieux ont été supplémentés de l'antibiotique approprié (ampicilline 100µg/ml et chloramphénicol 25µg/ml). Les préparations de plasmides ont été obtenues à l'aide de la trousse *EZ-10 spin column plasmid DNA miniprep* de BioBasic selon le protocole du fabricant.

Tableau I. Souches bactériennes

| Souches | Génotype | Résistance | Utilisation | Référence |
|----------------|---|------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>E. coli</i> | | | | |
| DH5α | <i>supE 44 hsdR 17 recA 1 endA 1 gyrA 96 thi -1 relA 1</i> | N/A | Transformation | Hanahan 1983 |
| ORN172 | <i>thr-1 leuB thi-1 ΔargF-lac U169 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rpsL tonA2 supE44 fimBEACDFGH::kan pilG1</i> | Km | Adhésion et surexpression | Woodall <i>et al.</i> 1993 |
| DEF145 | ORN172 avec pBAD24 contenant <i>stgABCD</i> sans le promotur natif de la souche ISP1820 (StgA_F et StgD_R) | Amp | Surexpression | Forest 2012 |
| DEF939 | ORN172 avec pBAD18cm contenant <i>stgABCD</i> sans le promoteur natif de la souche ISP1820 (StgA_F et StgD_R) | Cm | Surexpression | Cette étude |
| DEF940 | ORN172 avec pMMB207c contenant <i>stgABCD</i> sans le promoteur natif de la souche ISP1820 (StgA_F et StgD_R) | Cm | Adhésion et surexpression | Cette étude |
| DEF941 | ORN172 avec pTRC99A contenant <i>stgABCD</i> sans le promoteur natif de la souche ISP1820 (StgA_F et StgD_R) | Amp | Surexpression | Cette étude |
| DEF952 | DH5α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>staA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β-galactosidase | Cette étude |

| | | | | |
|------------------------|--|-----|-----------------------------------|-------------|
| DEF953 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>stbA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF955 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>stdA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF956 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>sefA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF957 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>stgA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF958 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>sthA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF959 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>pilL</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF966 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>fimA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF964 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>csgB</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF965 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>stcA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF987 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>safA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF1007 | ORN172 avec pSIF387 | Amp | Surexpression | Cette etude |
| DEF1008 | ORN172 avec pMMB207c contenant <i>tcfABCD</i> | Cm | Surexpression | Cette etude |
| DEF1009 | ORN172 avec pMMB207c | Cm | Surexpression | Cette etude |
| DEF1010 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>bcfA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF1011 | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>steA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DH5 α (pSIF219) | DH5 α avec pRS415 contenant la région en 5' de <i>tcfA</i> de la souche ISP1820 | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| ISP1820 | Souche sauvage pathogène | | | Hone 1991 |
| DEF664 | ISP1820 $\Delta bcfABCDEFG$ $\Delta csgCABDEFG$ $\Delta fimAICDHFZYXW$ $\Delta pilLMNOPQRSTUVWXYZ$ $\Delta safAEBCD$ $\Delta sefABCD$ $\Delta staGFEDCBA$ $\Delta stbEDCBA$ $\Delta stcDCBA$ $\Delta stdCBA$ $\Delta steABCDEF$ $\Delta stgABCD$ $\Delta sthEDCBA$ $\Delta tcfABCD$ | | Adhésion, biofilms, surexpression | Cette étude |
| DEF992 | ISP1820 avec le plasmide provenant de DEF955 | | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF994 | ISP1820 avec le plasmide provenant de DEF964 | | Rapporteur β -galactosidase | Cette etude |
| DEF1019 | DEF664 avec pMMB207c | | Surexpression | Cette etude |
| DEF1020 | DEF664 avec le plasmide provenant de DEF1008 | | Surexpression | Cette etude |

Légende : Les amorces utilisées pour générer les constructions contenues dans certaines souches sont indiquées entre parenthèses dans la colonne *Génotype*. N/A : Non-Applicable

Fusions transcriptionnelles *gfp* et *lacZ*. Les régions promotrices des 12 opérons putatifs des fimbriae de type chaperon-placiers du sérovar Typhi (Townsend et al. 2001) ainsi que celles de *csgB* et *pilL* ont été prédites à l'aide du logiciel BPROM (Softberry Inc. 2015) à partir de l'information de séquence disponible pour la souche CT18 rendue disponible dans la banque de donnée génomique du National Center for Biotechnology Information (Parkhill et al. 2001). Ces séquences ont été amplifiées par *PCR* à partir d'ADN génomique de la souche ISP1820 courtoisement fourni par Dr. Sébastien Sabbagh. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel *AmpliFX* (CNRS-Aix-Marseille 2013) et des sites de restriction uniques y ont été ajoutés en 5' (Tableau III). Les fragments générés par *PCR* ainsi que le plasmide pRS415 ont été digérés avec les enzymes EcoRI et BamHI puis purifiés sur gel d'agarose suite à une électrophorèse et finalement ligués en amont du gène *lacZ* dans le plasmide pRS415 à l'aide de la *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). Les mêmes fragments ont également été digérés avec EcoRI et ligués en amont du gène *gfp* dans le plasmide pRL1 digéré avec EcoRI et SmaI. Toutes ces constructions ont été transformées dans la souche *E. coli* DH5 α rendues compétentes selon la méthode au chlorure de calcium (Sambrook et Green 2012) afin de générer les souches identifiées pour rapporteurs β -galactosidase ou *gfp* (Tableau I). La taille et l'orientation des fragments ligués ont été confirmés par *PCR* à l'aide de l'amorce ayant servi à l'amplification à partir d'ADN génomique orientée dans le sens 5' vers 3' ainsi que d'une amorce située dans le plasmide (voir tableau III). Les plasmides extraits des souches *stdA::lacZ* (DEF955) et *csgB::lacZ* (DEF964) ont également été transformés chez la souche de *S. Typhi* ISP1820 par électroporation (Sambrook et Green 2012).

Tableau II. Plasmides

| Nom | Caractéristiques | Résistance | Utilisation | Référence |
|----------|---|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| pRS415 | Plasmide multicopies porteur du gène <i>lacZ</i> dénué de promoteur | Amp | Fusions transcriptionnelles | Simons <i>et al.</i> 1987 |
| pMMB207c | Plasmide multicopies porteur du promoteur <i>tac</i> répondant à la présence de lactose | Cm | Surexpression | Chen <i>et al.</i> 2004 |
| pTRC99A | Plasmide multicopies porteur du promoteur <i>tac</i> répondant à la présence de lactose | Amp | Surexpression | Amann <i>et al.</i> 1988 |
| pBAD18cm | Plasmide multicopies porteur du promoteur <i>araBAD</i> répondant à la présence d'arabinose | Cm | Surexpression | Guzman <i>et al.</i> 1995 |
| pSIF219 | pRS415 contenant la région 5' de <i>tcfA</i> | Amp | Rapporteur β -galactosidase | Leclerc 2014 |
| pSIF387 | pTRC99A contenant <i>tcfABCD</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Amp | Surexpression | Cette étude |
| pSIF395 | pMMB207c contenant <i>bcfABCDEFGF</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF396 | pMMB207c contenant <i>steABCDEF</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF397 | pMMB207c contenant <i>stgABCD</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF398 | pRL1 contenant la région 5' de <i>bcfA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF399 | pRL1 contenant la région 5' de <i>csgB</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF400 | pRL1 contenant la région 5' de <i>pilL</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF401 | pRL1 contenant la région 5' de <i>fimA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF402 | pRL1 contenant la région 5' de <i>sqfA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF403 | pRL1 contenant la région 5' de <i>sefA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF404 | pRL1 contenant la région 5' de <i>staA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF405 | pRL1 contenant la région 5' de <i>stbA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF406 | pRL1 contenant la région 5' de <i>stcA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF407 | pRL1 contenant la région 5' de <i>stdA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF408 | pRL1 contenant la région 5' de <i>steA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF409 | pRL1 contenant la région 5' de <i>stgA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF410 | pRL1 contenant la région 5' de <i>sthA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF411 | pRL1 contenant la région 5' de <i>tcfA</i> | Amp | Rapporteur <i>gfp</i> | Cette étude |
| pSIF412 | pMMB207c contenant <i>safAEBCD</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF413 | pMMB207c contenant <i>staGFEDCBA</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF414 | pMMB207c contenant <i>stbEDCBA</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |
| pSIF416 | pMMB207c contenant <i>sthEDCBA</i> sans le promoteur natif de ISP1820 | Cm | Surexpression | Cette étude |

Légende : Cm – Chloramphénicol, Amp - Ampicilline

Courbes de croissance et surexpression des opérons fimbriaires. Les souches ont été cultivées en milieu LB avec agitation pour ~18h à 37°C puis diluées 1:100 dans du milieu frais et remises en culture. Lorsque la turbidité, évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 600nm, atteignait ~0.5, l'agent inducteur d'expression (IPTG) a été ajouté à 1mM. Lors de la mise au point de l'induction de protéines, une concentration de 10μM a également été utilisée ainsi qu'une température de 30°C. Le nombre d'unités viables et la turbidité ont été déterminés après 1h, 4h et 24h de croissance post-induction (Miles 1938). Des aliquots de 1mL de culture ont été centrifugés à 8000g pendant 2 min puis resuspendus dans un volume de tampon de charge (62.5mM Tris/HCl pH 6.8, 10% v/v glycérol, 2% p/v SDS, 0.05% p/v β-mercaptoéthanol, 0.05% p/v bleu de bromophénol) et normalisé selon la DO₆₀₀. La visualisation des protéines totales des cultures a été effectuée suite à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide par coloration au bleu de Coomassie (Bio-Rad).

Clonage des fimbriae. Les séquences des 12 opérons fimbriaires putatifs de type chaperon-placier ont été amplifiées par réaction *PCR* à l'aide de la polymérase *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), débutant au codon de départ. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel *AmpliFX* (CNRS-Aix-Marseille 2013) et des sites de restriction uniques ont été ajoutés en 5' ainsi qu'un site de liaison au ribosome pour les amorces débutant au codon de départ (Tableau III). La prédiction des sites de restriction a été effectuée à l'aide du logiciel *Webcutter2* (Heiman 1997). Les plasmides pMMB207c, pTRC99A, pBAD18cm et pBAD24 ainsi que les divers inserts digérés (promoteurs et opérons) ont été purifiés sur gel à l'aide de la trousse d'extraction d'ADN *EZ-10 spin column DNA gel extraction kit* (Biobasic) avant d'être ligués à l'aide de la *T4 DNA ligase* (New England Biolabs) puis transformés dans la souche *E. coli* afimbriaire ORN172 préparées selon la méthode au chlorure de calcium (Sambrook et Green 2012). L'opéron putatif *tcfABCD* cloné dans pMMB207c a été extrait puis transformé chez *S. Typhi* possédant des délétions pour les 14 systèmes d'adhésion étudiés (DEF664) par électroporation (Sambrook et Green 2012). La taille des inserts a été confirmée par observation des produits de digestion des divers plasmides avec les mêmes enzymes que celles utilisées pour le clonage. L'orientation a été confirmée par *PCR* à l'aide d'une première amorce située dans le plasmide et d'une seconde dans l'orientation 3' vers 5' utilisée pour le clonage des promoteurs (Tableau III).

Tableau III : Amorces de clonage des promoteurs et opérons des fimbriae

| Séquence cible | Taille (kpb) | Nom de l'amorce | Site de restriction | Séquence |
|-------------------|--------------|--|---------------------|--|
| 5' <i>stgA</i> | 0,39 | Stg_Prom_F_EcoRI Stg_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcCGGGAGATGAGAATAACGGA gtggatccAGTAGAAGACAGAACCAGAGCG |
| 5' <i>csdB</i> | 0,74 | Csg_Prom_F_Short_EcoRI Csg_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcAGATGTTGCACTGCTGTGGGTT gcggatccGCGCACCCAGTATTGTCAACAT |
| 5' <i>pilL</i> | 0,39 | Pil_Prom_F_Short_EcoRI Pil_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcAGGTATCCAGCAGGGTATTAGCA ccggatccTCAGGCAGAAAAGCGCTTGT |
| 5' <i>steA</i> | 0,58 | Ste_Prom_F_2_EcoRI Ste_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcACAGGTGTTGAATGCTACCTTTCCC gcggatccGCCGGAGACAATTCCATAACTAAA |
| 5' <i>sthA</i> | 0,31 | Sth_Prom_F_EcoRI Sth_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcAAATCCAGTCATCTACCGTACTTC gcggatccGTGGATGCTACGGCAGTTAACA |
| 5' <i>stdA</i> | 0,73 | Std_Prom_F_EcoRI Std_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcGTTCTTTGCTGTCGGCATTG aaggatccACAGAAGCGCCATACATCATACCG |
| 5' <i>stcA</i> | 0,34 | Stc_Prom_F_EcoRI Stc_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcAATTCGCGAGGCCATATCA gcggatccCCCAGCGCTCATAAATACAGCA |
| 5' <i>stbA</i> | 0,41 | Stb_Prom_F_Short_EcoRI Stb_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcCATCGGGAGGTTTAACTGATACGG gcggatccGCGAGCCTGTGATCATGTCTAAATA |
| 5' <i>staA</i> | 0,28 | Sta_Prom_F_EcoRI Sta_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcCAGCCGCTTAATGCAATTAACA atggatccTGCGGCAGCTAAAATCGCTT |
| 5' <i>sefA</i> | 0,40 | Sef_Prom_F_EcoRI Sef_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gcgaattcCTTAGTCGATGTCCACTCTTGCT acggatccTGGGCACTGCCACATGCAATTA |
| 5' <i>safA</i> | 0,17 | Saf_Prom_F_EcoRI SafA_R2 (NO SITE) | EcoRI N/A | cagaattcTGTTATTACCGCCAGGGAT gtccaggtGCAGTTATCATGCTCAACACGCTTG |
| 5' <i>fimA</i> | 0,48 | Fim_Prom_F_Short_EcoRI Fim_Prom_R_2_BamHI | EcoRI BamHI | gggaattcGGCGGCATAATGCGACATTT gcggatccTAACGGCACAGGCTGCATAAAC |
| 5' <i>bcfA</i> | 0,24 | Bcf_Prom_F_EcoRI Bcf_Prom_R_BamHI | EcoRI BamHI | gggaattcAACTCACGCGTTGAGTAGCTG gcggatccCAACATTCCGCCAAAGGCAA |
| 5' <i>tcfA</i> | 0,59 | TcfAF prom TcfAR prom (NO SITE) | XbaI N/A | gctctagaCATGATGATCAGTCTATTTGTGGC AATTCTGCCGCCATGGGATA |
| <i>tcfABCD</i> | 5,30 | Tcf_Opéron_F_SacI Tcf_Opéron_R_XbaI | SacI XbaI | cgcgagctcagaaacagaccATGAATTTTAAAGATACTCTT CC gctctagaAAAAACCATATAAGAAAGATATCAA |
| <i>safAEBCD</i> | 5,10 | Saf_Opéron_F_EcoRI Saf-RC | EcoRI XbaI | gcgaattcaggaaacagaccATGAAAAACATAAAAAAAT gctctagaTGCTAACCATATTTGCCTTGAG |
| <i>sefABCD</i> | 4,52 | Sef_Opéron_F_EcoRI sefD_R4_SacI | EcoRI SacI | aggaattcaggaaacagaccATGCGTAAATCAGCATC gctctagaatgccgtaggaatgtcaagc |
| <i>staGFEDCBA</i> | 7,20 | Sta_Opéron_F_SacI Sta_Opéron_R_XbaI | SacI XbaI | cgagagctcagaaacagaccATGAAAAAGCGATTTTAGC actctagaATTGCGTTGCGGTTTCGTT |
| <i>stbEDCBA</i> | 6,34 | Stb_Opéron_F_SacI Stb_Opéron_R_XbaI | SacI XbaI | cgagagctcagaaacagaccATGTCTATGAAAAATATTTA gctctagaTGCTGAATTCTGCGCTGTC |
| <i>stcDCBA</i> | 4,91 | Stc_Opéron_F_XbaI Stc_Opéron_R_SalI | XbaI SalI | gctctagaaggaaacagaccATGAAACGTTCACTTATT cggtcgacAGATTGTCATCCCGGTCACT |
| <i>stdCBA</i> | 4,10 | Std_Opéron_F_SacI StdC R4 | SacI XbaI | cgagagctcagaaacagaccATGCGTAATAAAAAATACT gctctagaatacctgctcaaccgata |
| <i>steABCDEF</i> | 5,76 | Ste_Opéron_F_SacI SteD R4 | SacI XbaI | cgagagctcagaaacagaccATGAAGTCATCTCATTTTTG gctctagaCCAGAGCATCAATGCCTTT |

| | | | | |
|--|------|---|---------------|--|
| <i>stgABCD</i> | 5,06 | Stg_Opéron_F_SacI STGD-R | SacI XbaI | gcgagctcaggaaacagaccATGAACTGAATTTAATTGC gctctagaCATTGATATGACTTATTTTG |
| <i>sthEDCBA</i> | 5,75 | Sth_Opéron_F_BamHI SthE R4 | BamHI XbaI | gcggatccaggaaacagaccATGTTTAATAAGAAAATTATC A gctctagaGCCATCTGGACTGGTATTCG |
| <i>bcfABCDEFGF</i> | 6,82 | Bcf_Opéron_F_SacI Bcf_Opéron_R_XbaI | SacI XbaI | cggagctcaggaaacagaccATGAAAAAGCCTGTACTAGCA gctctagacgttcgataagatcggaag |
| <i>fimAICDHFZY</i> <i>XW</i> | 9,42 | Fim_Opéron_F2_BamHI Fim_Opéron_R3_XbaI | BamHI XbaI | gcggatccaggaaacagaccATGAAACATAAATTAATGACC gctctagatcaggcactcctgagtcagt |
| Insert de pRS415 orientation correcte | * | Amorce 5' ► 3' du sens codant | N/A | *** |
| | | lacZaR | N/A | GGCTGCGCAACTGTTGGG |
| Insert de pRS415 orientation incorrecte | ** | lacZaR | N/A | GGCTGCGCAACTGTTGGG |
| | | Amorce 3' ► 5' du sens codant | N/A | *** |

Observation par microscopie électronique à transmission. Les souches d'*E. coli* ORN172 afimbriaire et de *S. Typhi* ISP1820 afimbriaire possédant l'opéron *tcfABCD* sous le contrôle d'un promoteur inductible (DEF1008, DEF1009, DEF1019 et DEF1020) ont été cultivées selon les conditions décrites dans la section *courbe de croissance et surexpression des opérons fimbriaires*. Les bactéries ont été lavées avec du PBS puis resuspendues dans une solution de glutaraldéhyde 2% avant d'être adsorbées pendant 2 minutes sur des grilles de microscopie à base de nickel recouverte de nickel et formvar. Les grilles ont ensuite été lavées trois fois avec de l'eau milli-Q. L'excès de liquide a été enlevé et une goutte d'acide phosphotungstique 2% (coloration négative) a été déposée sur la grille. Les bactéries ont été observées sur un microscope électronique CM-100 de *Philips* opéré à 60kV et l'image a été acquise sur une caméra numérique AMT XR-80 CCD de *Advanced Microscopy Techniques*.

Rapporteur d'expression β -galactosidase. Les 14 souches d'*E. coli* générées pour la détermination du niveau d'expression des systèmes d'adhésion putatifs par fusion de leurs promoteurs avec le gène *lacZ* (Tableau I) ont été cultivées avec et sans agitation en milieu LB, en milieu LB supplémenté d'agar à 1.5% ainsi qu'en milieu M63 supplémenté ou non en fer libre avec agitation après 18h de croissance selon la méthode décrite précédemment (Miller 1972). Le niveau d'expression de *csg* et *std* a également été évalué en milieu M63 supplémenté ou non en fer libre chez *S. Typhi*.

Tableau IV. Prédiction des poids moléculaires et des fonctions des protéines des opérons des fimbriae de type chaperon-placier chez *S. Typhi*

| Opéron | Protéine | Poids moléculaire (kDa) | Fonction putative |
|-----------------------------|----------|-------------------------|-----------------------------|
| <i>bcfABCDEFGG</i> | BcfA | 18.2 | Recombinase |
| | BcfB | 25.5 | Chaperon |
| | BcfC | 94.6 | <i>Placier</i> |
| | BcfD | 36.0 | Adhésine |
| | BcfE | 19.5 | Sous-unité majeure |
| | BcfF | 17.7 | Sous-unité |
| | BcfG | 26.6 | <i>Chaperon</i> |
| <i>fimAICDHFZYXW</i> | FimA | 18.8 | Sous-unité majeure |
| | FimI | 19.0 | <i>Sous-unité majeure</i> |
| | FimC | 24.9 | Chaperon |
| | FimD | 95.0 | Placier |
| | FimH | 36.1 | Adhésine |
| | FimF | 18.0 | Sous-unité mineure |
| | FimZ | 23.5 | Régulateur transcriptionnel |
| | FimY | 27.8 | Régulateur transcriptionnel |
| | FimX | 11.4 | Fonction inconnue |
| | FimW | 23.4 | Régulateur transcriptionnel |
| <i>safAEBCD</i> | SafA | 17.4 | Sous-unité majeure |
| | SafE | 17.3 | <i>Sous-unité</i> |
| | SafB | 26.7 | Chaperon |
| | SafC | 91.4 | Placier |
| | SafD | 17.0 | Adhésine |
| <i>sefABCD</i> | SefA | 16.9 | <i>Sous-unité majeure</i> |
| | SefB | 28.5 | Chaperon |
| | SefC | 92.2 | Placier |
| | SefD | 16.2 | <i>Adhésine</i> |
| <i>staABCDEFGG</i> | StaA | 20.0 | Sous-unité majeure |
| | StaB | 26.9 | Chaperon |
| | StaC | 94.7 | Placier |
| | StaD | 19.7 | Sous-unité |
| | StaE | 21.5 | Fonction inconnue |
| | StaF | 21.4 | Sous-unité |
| | StaG | 42.6 | Adhésine |
| <i>stbABCDE</i> | StbA | 18.4 | Sous-unité majeure |
| | StbB | 28.0 | Chaperon |
| | StbC | 94.5 | Placier |
| | StbD | 47.4 | Placier |
| | StbE | 28.5 | Chaperon |
| <i>stcABCD</i> | StcA | 18.7 | Sous-unité majeure |
| | StcB | 25.2 | Chaperon |
| | StcC | 92.3 | Placier |

| | | | |
|------------------|------|------|---------------------------|
| <i>stdABC</i> | StdD | 36.5 | Adhésine |
| | StdA | 20.2 | Sous-unité majeure |
| | StdB | 89.9 | Placier |
| | StdC | 27.5 | Chaperon |
| <i>steABCDEF</i> | SteA | 19.8 | <i>Sous-unité majeure</i> |
| | SteB | 98.6 | Placier |
| | SteC | 28.5 | Chaperon |
| | SteD | 17.7 | Sous-unité |
| | SteE | 16.8 | Sous-unité |
| | SteF | 18.8 | Sous-unité |
| <i>stgABCD</i> | StgA | 19.6 | Sous-unité majeure |
| | StgB | 25.9 | Chaperon |
| | StgC | 92.6 | <i>Placier</i> |
| | StgD | 38.0 | Adhésine |
| <i>sthABCDE</i> | SthA | 19.0 | Sous-unité majeure |
| | SthB | 24.8 | Chaperon |
| | SthC | 89.9 | <i>Placier</i> |
| | SthD | 19.4 | Adhésine |
| | SthE | 38.7 | <i>Sous-unité</i> |
| <i>tcfABCD</i> | TcfA | 25.7 | Chaperon |
| | TcfB | 20.3 | Sous-unité majeure |
| | TcfC | 97.7 | Placier |
| | TcfD | 39.8 | Adhésine |

Légende : Les poids moléculaire ont été prédits selon la séquence en nucléotides obtenue en ligne dans les bases de données du NCBI (Geer *et al.* 2010). Les fonctions sont en italique lorsqu'il s'agit d'un pseudogène selon l'annotation disponible.

Rapporteur d'expression fluorescent (*gfp*). L'évaluation du niveau d'expression de l'opéron *saf* a été effectuée par fusion transcriptionnelle de son promoteur en amont du gène rapporteur *gfp* (plasmide pSIF402 transformé chez DH5 α , voir Tableau II). Les bactéries ont été cultivées pendant ~18h en LB avec agitation avant d'être lavées une fois dans du PBS puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 2%. Le niveau d'expression de la GFP a été mesuré par cytométrie en flux sur un *FACSCanto II* de *BD Bioscience* équipé d'un laser argon-ion à 488nm détectée en FL1. Les données collectées cumulent 10000 évènements et ont été analysées en utilisant *BD FACSDiva 8.0*. Les paramètres de *forward*- et *side-scatter* ont été réglées en utilisant une souche bactérienne exprimant constitutivement *gfp* afin d'exclure les débris et agrégats.

Essais d'adhésion sur cellules épithéliales. Les cellules épithéliales INT-407 (ATCC CCL-6) utilisées sont dérivées de l'iléum et du jéjunum d'un embryon caucasien de 2 mois. Elles sont cultivées en atmosphère de 5% de CO₂ à 37°C dans des flasques pour culture cellulaire adhérentes (*Sarstedt*) et baignent dans le milieu EMEM (*Wisent*) supplémenté de 25mM d'acide N-2-hydroxyéthyl piperazine-N-2-ethanesulfonique (HEPES) et 10% de sérum de veau fœtal (*Wisent*) dont le complément a été inactivé à la chaleur. Une flasque de 75 cm² était ensemencée de manière hebdomadaire à raison d'approximativement 5x10⁵ cellules pour utilisation la semaine subséquente ainsi qu'une seconde flasque à raison d'approximativement 5x10⁶ cellules pour utilisation le lendemain. La viabilité lors de chacun des passages était estimée avec une coloration au bleu de trypan et dépassait systématiquement 95%. À partir de ces flasques, une plaque de culture à 24 puits pour cellules adhérentes (*Greiner Bio One*) était inoculée de 2x10⁵ cellules viables par puits la veille de l'essai d'adhésion. Le lendemain, une heure avant l'ajout des bactéries, les cellules épithéliales étaient lavées avec du PBS et le milieu EMEM ajouté de nouveau pour enlever les cellules mortes ou non adhérentes. Une confluence d'approximativement 75-85% était observée par microscopie optique. Des pré-cultures bactériennes étaient incubées la veille de l'essai à 37°C avec agitation en LB et étaient diluées 1 :100 dans du milieu frais le jour de l'essai. La surexpression des opérons était induite selon la méthode décrite dans la section *courbes de croissance et surexpression des opérons fimbriaires* pendant 1h, suite à quoi les DO₆₀₀ servaient à déterminer le volume de culture nécessaire pour atteindre une multiplicité d'infection de 100 :1 par rapport aux cellules épithéliales pour les souches d'*E. coli* et de 20 :1 pour les souches de *S. Typhi*. Les bactéries étaient inoculées en duplicata techniques, puis les plaques agitées manuellement et incubées pendant 90 minutes à 37°C en atmosphère de 5% de CO₂ pour laisser les bactéries interagir avec les cellules épithéliales. Ce délai écoulé, les puits étaient lavés manuellement à trois reprises avec du PBS et les cellules épithéliales lysées avec une solution de PBS-DOC 0.1% (acide désoxycholique), un détergeant n'ayant pas d'effet létal sur les bactéries. La quantité de bactéries de ces lysats et de l'inoculum initial ont été déterminées par dilution décimales et inoculation en milieu LB supplémenté d'agar à 1.5% après ~18h de croissance à 37°C et décompte du nombre de colonies. Le taux d'adhésion est calculé en divisant la quantité de bactéries récupérées après l'essai d'adhésion par la quantité de bactéries inoculées au départ multiplié par 100.

Résultats

Profils d'expression des fimbriae

Un opéron fonctionnel doit impérativement être sous le contrôle d'un promoteur pouvant induire l'expression de ses gènes. Deux approches ont été entreprises en utilisant des gènes rapporteurs différents afin de déterminer si les promoteurs des 14 opérons fimbriaire de *S. Typhi* souche ISP1820 sont capables d'induire la transcription des gènes en aval. Une première série de constructions a été fabriquée en clonant la région en amont du premier gène codant des différents fimbriae devant le gène rapporteur *lacZ* au sein d'un plasmide multi-copies (pRS415, voir Tableau II). Un tel système permet, à l'aide d'un essai enzymatique simple, de déterminer le niveau d'activité de la β -galactosidase et par conséquent de mesurer l'expression du promoteur à l'étude dans différentes conditions expérimentales. Une seconde série de construction a été fabriquée en clonant la même région mais devant le gène rapporteur *gfp* contenu dans un autre plasmide multi-copies (pRL1, voir Tableau II). Ce second système permet d'évaluer le niveau d'expression à la résolution de bactéries individuelles, ce qui a pour avantage de permettre d'observer une variation de phase au sein d'une population. De plus, il est possible d'évaluer le niveau d'expression chez les bactéries contenues dans des cellules suite à des essais de phagocytose, par exemple. Tant par soucis de réduire les risques biologiques des manipulations ainsi que par simplicité de l'approche, ces constructions ont été transformées chez une souche d'*E. coli* non pathogène (DH5 α , voir Tableau I).

Nous avons restreint nos d'études à quelques-unes des conditions reconnues pour influencer l'expression de fimbriae chez d'autres entérobactéries (Korea *et al.* 2010, Felek *et al.* 2011). La régulation de plusieurs facteurs de virulence est influencée par la disponibilité en fer libre. La disponibilité en nutriments est également susceptible d'influencer l'expression des fimbriae. Finalement, l'expression d'au moins un fimbria de *S. Typhimurium* (*csg*) est induite lorsque la tension en oxygène du milieu est inférieure à l'atmosphère ambiante. Sauf lorsque mentionné, les dosages ont été effectués sur des cultures en phase stationnaire après une incubation d'approximativement 16h avec agitation.

Nous avons utilisé deux contrôles différents au cours de ces expériences. D'abord, une activité enzymatique nulle est mesurée en remplaçant la culture bactérienne par un milieu stérile. Nous

avons inclus un contrôle supplémentaire pour nous assurer que l'activité enzymatique mesurée chez les souches à l'étude est réellement associée à la présence d'un promoteur fonctionnel en amont du gène *lacZ*. À cette fin, l'activité enzymatique de la β -galactosidase a été dosée chez une souche bactérienne portant un plasmide pRS415 dans lequel un promoteur démontrant une forte activité a été cloné en sens inverse. Cette dernière souche possède une activité enzymatique nulle, ce qui indique que l'expression est entièrement dépendante de la présence d'un promoteur fonctionnel correctement orienté (résultats non présentés).

Rapporteurs β -galactosidase

Afin d'étudier l'effet de la disponibilité en nutriments, nous avons évalué l'activité des promoteurs des fimbriae en milieu minimal (M63 avec et sans fer) et en milieu riche (LB). La comparaison entre un milieu minimal supplémenté ou non en fer nous permet de mettre en évidence le rôle du fer libre dans la régulation de l'expression des fimbriae. La comparaison entre le milieu LB et le milieu M63 supplémenté en fer permet de déterminer la différence entre un milieu pauvre et riche, indépendamment de la présence de fer libre. Tous les promoteurs des opérons fimbriaire possèdent une activité détectable (Figure 11). Les trois opérons les plus fortement exprimés dans les trois milieux de cultures mentionnés sont *saf*, *stc* et *sth*. L'expression de *saf*, *stc* et *std* semble favorisée par l'ajout de fer en milieu minimal. L'effet est cependant faible et est seulement significatif chez *S. Typhi*. L'expression de *bcf* ainsi que de *csg* est supérieure lorsque le milieu ne contient pas de fer libre (tant LB que M63 avec fer). Les opérons *bcf*, *csg*, *pil*, *sef* et *sta* sont plus fortement exprimés en milieu minimal supplémenté en fer qu'en milieu riche. Inversement, les opérons *stc*, *stg* et *sth* sont plus fortement exprimés en milieu riche qu'en milieu minimal avec fer. Le niveau d'expression des opérons *fim*, *stb*, *std*, *ste* et *tef* n'est pas significativement influencée par la disponibilité en fer libre ou la richesse nutritionnelle dans les conditions expérimentales étudiées.

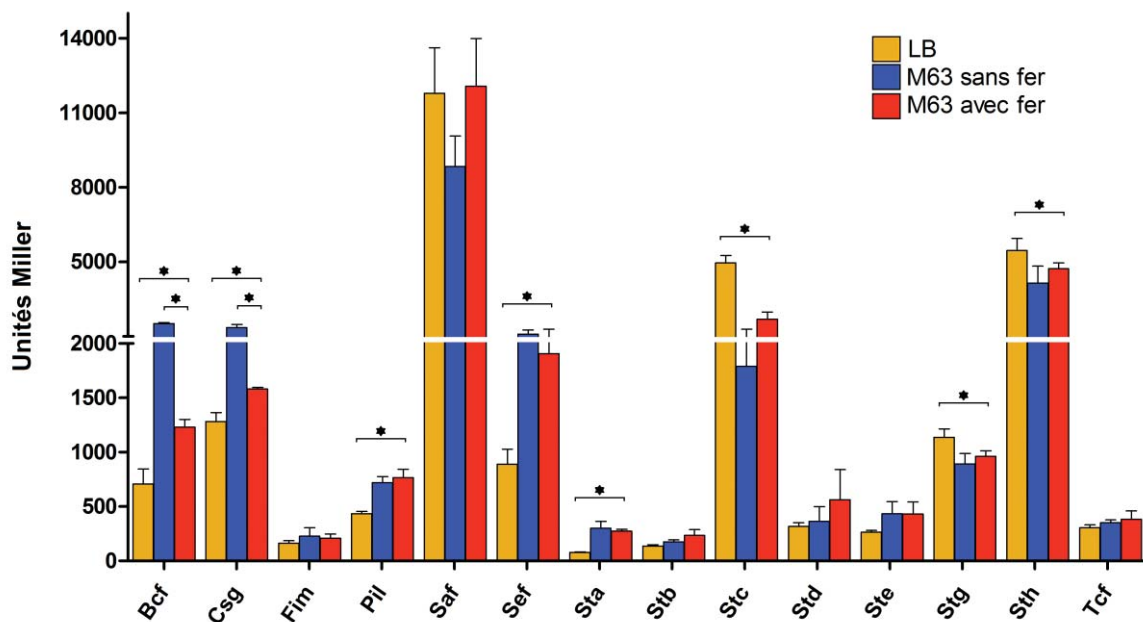


Figure 11 : Effet de la disponibilité en fer et en nutriments sur l'expression des fimbriae.

L'expression des opérons codant pour les 14 systèmes d'adhésion retrouvés chez *S. Typhi* ISP1820 a été évaluée par fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec la β -galactosidase portée sur le plasmide multicopies pRS415 et transformé chez *E. coli* DH5 α . Les souches ont été cultivées en milieu riche (LB) ainsi qu'en milieu minimal avec et sans fer (M63) avec agitation pendant 16h à 37°C. Les données sont représentées la moyenne d'au moins trois mesures expérimentales \pm DS. Les différences significatives ($p < 0.05$) sont indiquées par un astérisque.

Nous avons aussi voulu déterminer si l'expression des fimbriae de *S. Typhi* est influencée par l'aération des cultures par agitation. Afin d'étudier cette variable, nous avons comparé des cultures aérées par agitation et des cultures non agitées, ce qui diminue l'oxygène disponible. À l'exception de *bcf*, *csg* et *std*, l'expression des opérons est significativement moindre lorsque les souches sont cultivées sans agitation. L'effet est plus marqué pour les opérons *fim*, *sef*, *stc* et *stg* (Figure 12). L'expression d'aucun opéron n'est favorisée par une disponibilité réduite en oxygène.

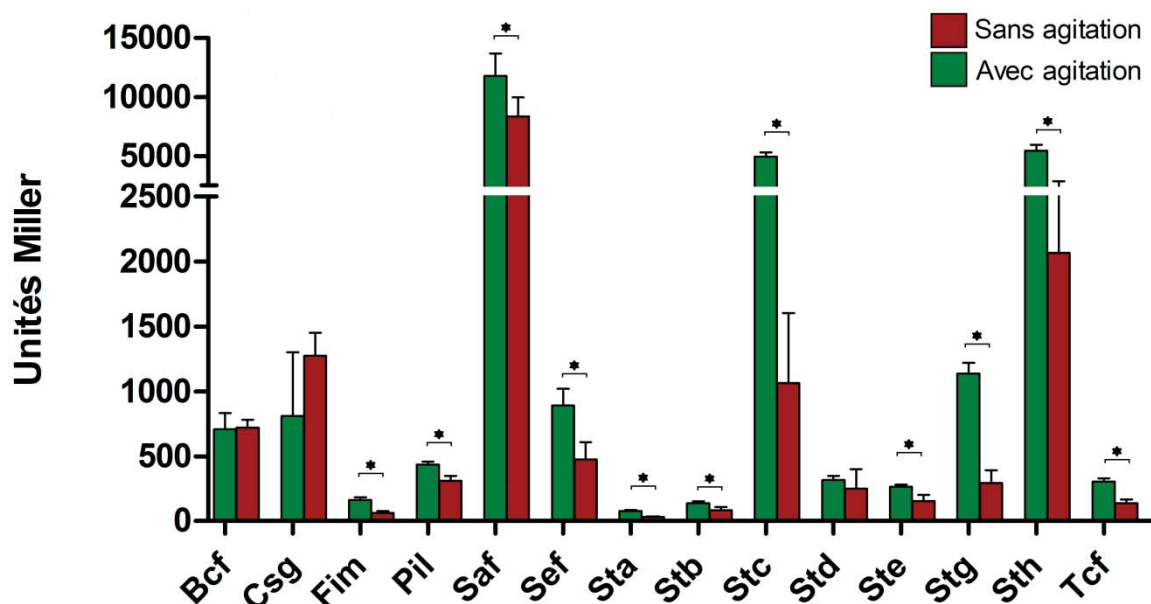


Figure 12 : Effet de l'agitation des cultures sur l'expression de fimbriae.

L'expression des opérons codant pour les 14 systèmes d'adhésion retrouvés chez *S. Typhi* ISP1820 a été évaluée par fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec la β -galactosidase portée sur le plasmide multicopies pRS415 et transformé chez *E. coli* DH5 α . Les souches ont été cultivées en milieu riche (LB) avec ou sans agitation pendant 16h à 37°C. Les données sont présentées représentent la moyenne d'au moins trois mesures expérimentales \pm DS. Les différences significatives ($p < 0.05$) sont indiquées par un astérisque.

Sachant que certains fimbriae chez d'autres espèces promeuvent l'adhésion entre bactéries, nous avons voulu déterminer si une culture sur milieu solide favoriserait l'expression de fimbriae chez *S. Typhi* par rapport à une culture en bouillon. À cette fin, nous avons comparé le niveau d'expression des différents fimbriae de cultures en bouillon LB ou sur gélose LB (Figure 13). L'expression des opérons *fim* et *stg* est réduite sur milieu solide par rapport au milieu liquide. À l'opposé, les opérons *sef*, *sta*, *stb* et *std* sont exprimés plus fortement pendant une croissance sur un milieu solide. L'expression de *bcf*, *csg*, *pil*, *saf*, *stc*, *sth* et *tcf* n'est pas significativement différente entre une culture en bouillon et une culture en milieu solide.

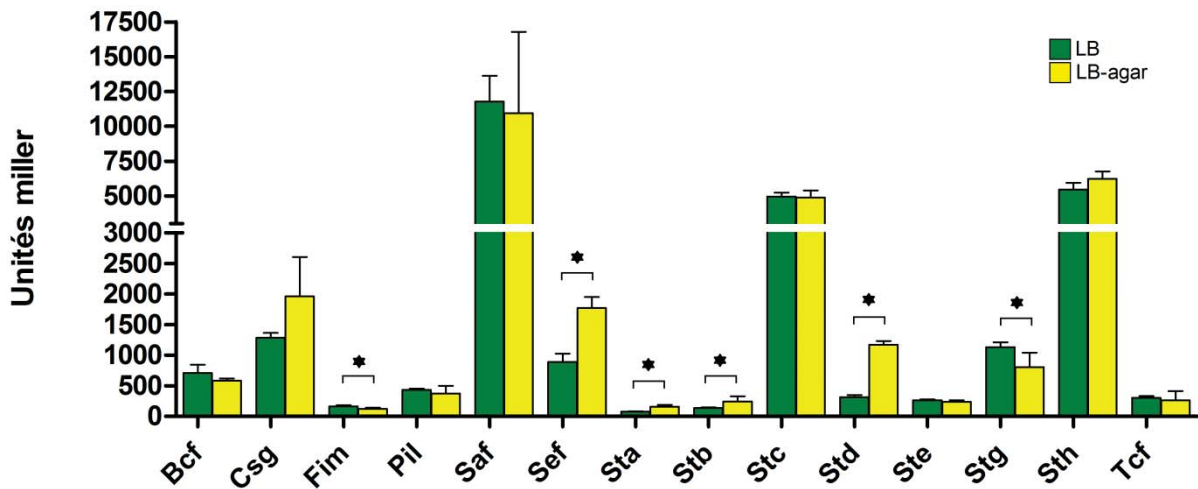


Figure 13 : Effet de la croissance en milieu solide sur l'expression des fimbriae.

L'expression des opérons codant pour les 14 systèmes d'adhésion retrouvés chez *S. Typhi* ISP1820 a été évaluée par fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec la β -galactosidase portée sur le plasmide multicopies pRS415 et transformé chez *E. coli* DH5 α . Les souches ont été cultivées en milieu riche liquide (LB) ou solide (LB-agar) après 16h de croissance à 37°C. Les données sont présentées représentent la moyenne d'au moins trois mesures expérimentales \pm DS. Les différences significatives ($p < 0.05$) sont indiquées par un astérisque.

Une dernière série d'expériences a été effectuée afin de déterminer si *E. coli* est un organisme modèle adéquat pour évaluer d'une part si les promoteurs des fimbriae de *S. Typhi* sont exprimés et d'autre part s'ils répondent de manière similaire chez ces deux organismes. Deux des constructions générées chez *E. coli* DH5 α ont été transformées par électroporation chez la souche de *S. Typhi* ISP1820. L'activité de ces deux promoteurs a été évaluée dans deux conditions expérimentales afin de déterminer s'ils répondent de manière similaire (Figure 14). Tout d'abord, l'activité des promoteurs dans une condition donnée est supérieure chez *S. Typhi* par rapport à *E. coli* dans toutes les conditions étudiées. On remarque également que l'expression de *csgBAC* est supérieure en milieu minimal M63 sans fer par rapport au milieu M63 avec fer, tant chez *E. coli* que chez *S. Typhi*. Chez *E. coli*, l'expression de *stdCBA* a une tendance à être inférieure en milieu M63 sans fer par rapport au milieu M63 avec fer. Chez *S. Typhi*, l'expression est inférieure en milieu M63 sans fer par rapport au milieu M63 avec fer. Constatant que les promoteurs répondent de la même manière entre ces deux organismes,

nous avons poursuivi l'évaluation de l'activité des promoteurs chez *E. coli* dans différentes conditions expérimentales.

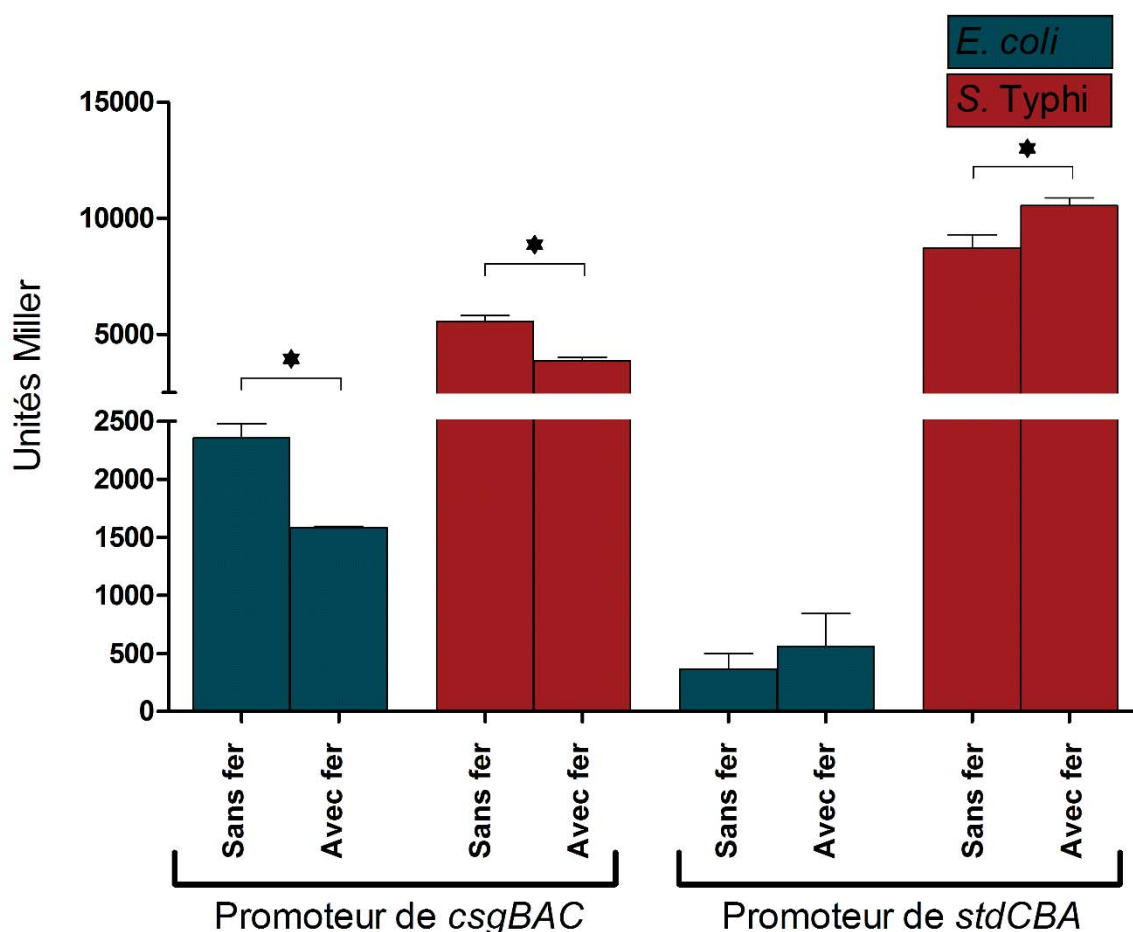


Figure 14: Expression comparative des fimbriae entre *E. coli* et de *S. Typhi*.

L'expression des opérons *csgBAC* et *stdBCA* a été évaluée par fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec la β -galactosidase portée sur le plasmide multicopies pRS415. Les souches ont été cultivées en milieu minimal M63 avec et sans fer avec agitation après 16h de croissance à 37°C, tant chez *E. coli* DH5a que chez *S. Typhi* ISP1820. Les données représentent la moyenne d'au moins trois mesures expérimentales \pm une déviation standard (DS). Les différences significatives ($p < 0.05$) sont indiquées par un astérisque.

Rapporteur d'expression fluorescent (*gfp*)

En plus de doser enzymatiquement l'expression des 14 systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi*, nous avons voulu utiliser un autre gène rapporteur *gfp*, codant pour la protéine fluorescente verte (eGFP). Ceci permet d'utiliser une mesure de niveau d'expression à la

résolution de cellules individuelles à l'aide d'un cytomètre en flux. Ainsi, il est possible d'observer une variation de phase au sein d'une population, ce qui est impossible avec des fusions utilisant la β -galactosidase. De plus, il est possible de mesurer un niveau d'expression lors de l'interaction des bactéries avec des cellules hôtes, par exemple suite à des essais d'invasion, de phagocytose ou de survie avec des macrophages. On a d'abord voulu valider la détection de l'expression des opérons dans une population bactérienne.

Deux contrôles ont été utilisés lors de cette expérience. Une souche exprimant *gfp* de manière constitutive (DEF091) a servi à régler les paramètres d'acquisition en termes de taille et de granularité cellulaire (Figure 15A). Une souche d'*E. coli* possédant le plasmide pRL1 sans insert (DEF205) a servi comme contrôle négatif de fluorescence afin de délimiter les zones d'acquisition par rapport au contrôle positif (Figure 15B et C). Le niveau d'expression des différents opérons fimbriaires ont ensuite été évalués. Aucune population bactérienne n'exprimait la *gfp* à un niveau supérieur au contrôle négatif. Un exemple représentatif est présenté en Figure 15D. L'expression des différents opérons n'ont donc pas pu être détecté à l'aide de cette méthode.

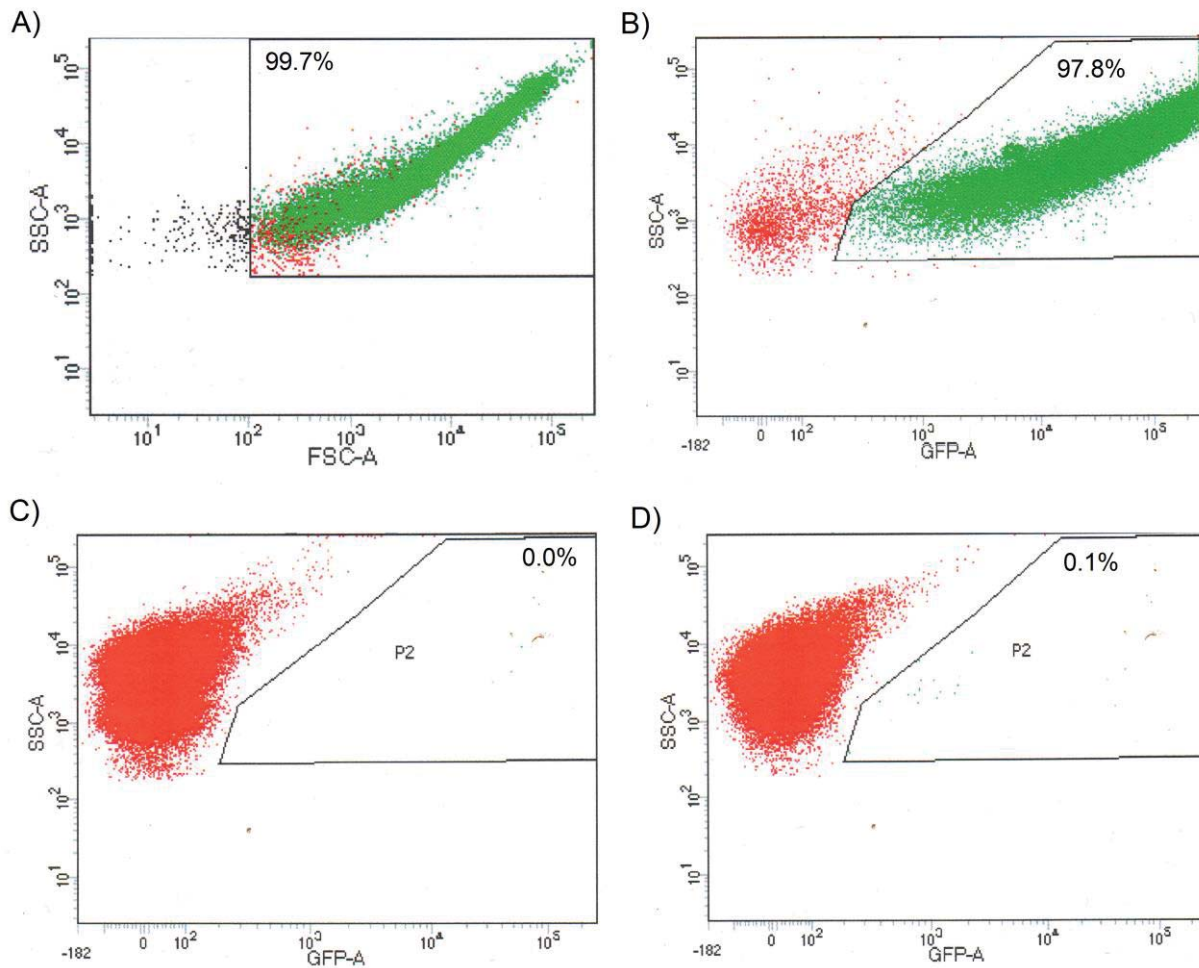


Figure 15 : Expression des l'opérons fimbriaires de *S. Typhi* par rapporteur fluorescent.

L'expression de tous les opérons ont été évaluée par fusion transcriptionnelle de leurs promoteur avec la *gfp* portée sur le plasmide multicopies pRL1 et transformé chez *E. coli* DH5 α . Les souches ont été cultivées en milieu riche liquide (LB) pendant 16h à 37°C. Les données compilent l'acquisition de 100 000 évènements. En vert, on observe les bactéries fluorescentes et en rouge, celles qui ne le sont pas. A) Zone d'acquisition en terme de taille (FSC-A) et granularité (SSC-A). B) Fluorescence de la souche exprimant la *gfp* de manière constitutive (contrôle positif). D) Fluorescence de la souche portant un plasmide où l'expression de *gfp* est sous le contrôle du promoteur de l'opéron *saf*. C'est un exemple représentatif du niveau d'expression obtenu chez les 14 différents systèmes.

Mise au point du système d'expression inductible

Afin d'étudier fonctionnellement des opérons codants pour des fimbriae putatifs, il a d'abord été question de mettre au point un système d'expression. Le plasmide devait nous permettre de réguler l'expression d'un opéron entier à l'aide d'un promoteur inductible. Quatre plasmides inductibles ont été choisis, soit les plasmides pTRC99A et pMMB207c, possédant un promoteur inductible à l'IPTG, et les plasmides pBAD18cm et pBAD24, qui possèdent un promoteur inductible à l'arabinose (voir Tableau II). De plus, ces plasmides diffèrent en ce qui a trait au marqueur de sélection qu'ils portent. La résistance à l'ampicilline est conférée par pBAD24 et pTRC99A tandis que la résistance au chloramphénicol est conférée par pBAD18 et pMMB207c. Les quatre plasmides possèdent une origine de répllication compatible chez les souches d'*E. coli* ORN 172 et de *S. Typhi* ISP1820. La souche d'*E. coli* ORN172 a été choisi principalement en raison du fait qu'elle n'exprime aucun fimbria et que l'opéron *fim* a été délété (Woodall *et al.* 1993). De plus, des raisons pratiques nous ont menées à concentrer nos travaux initiaux chez *E. coli*, notamment car cette souche est facilement transformable à l'aide des produits de ligation, ce qui est bien moins efficace chez *S. Typhi*. La souche de *S. Typhi* ISP1820, isolée d'un cas clinique de fièvre typhoïde, a également été manipulée génétiquement afin de déléter les 14 systèmes d'adhésion putatifs de son génome (DEF664). Ceci permet ensuite de réintroduire individuellement les opérons fimbriaires clonés sur un vecteur d'expression inductible. Ainsi, il est possible de comparer différents phénotypes associés à l'expression d'un seul fimbria chez une souche de *S. Typhi*.

Nous avons décidé de cibler l'opéron *stgABCD* comme premier candidat à étudier car des travaux précédents dans notre laboratoire avaient été en mesure de révéler son expression tant par immunobuvardage que par microscopie électronique lorsque cloné dans le plasmide pBAD24 (DEF145) (Forest 2012). Les amorces utilisées pour cloner *stgABCD* dans pBAD18cm, pMMB207c et pTRC99A figurent dans le Tableau III. Ceci a permis de respectivement générer les souches DEF939, DEF940 et DEF941 (Tableau II).

L'opéron *stg* a été induit pour une heure et trois heures en présence de l'inducteur approprié et un extrait de protéines totales a été chargé sur gel d'acrylamide pour les cultures des quatre souches contenant les vecteurs d'expression. Un aliquot de la culture non induite a servi de

contrôle. Il a été possible de mettre en évidence l'accumulation d'une protéine d'environ 45 kDa suite à l'induction de *stgABCD* dans les quatre vecteurs d'expression, ce qui devrait correspondre à l'expression de l'adhésine StgD. De plus, on observe l'accumulation d'une protéine d'environ 18 kDa dans les plasmides pMMB207c, pBAD18cm et pBAD24, ce qui devrait correspondre à l'expression du placier tronqué (pseudogène) StgC (Figure 16 et tableau IV).

Suite à cette première mise au point, nous avons décidé de poursuivre le clonage uniquement avec les plasmides pMB207c et pTRC99A, bien que nous ayons aperçu des protéines exprimées de manière similaire entre les quatre vecteurs chez *E. coli*. Ceci est en raison de la capacité de *S. Typhi* d'assimiler l'arabinose, ce qui pourrait potentiellement limiter l'expression des protéines dans les vecteurs inducible par cet agent (pBAD18cm et pBAD24).

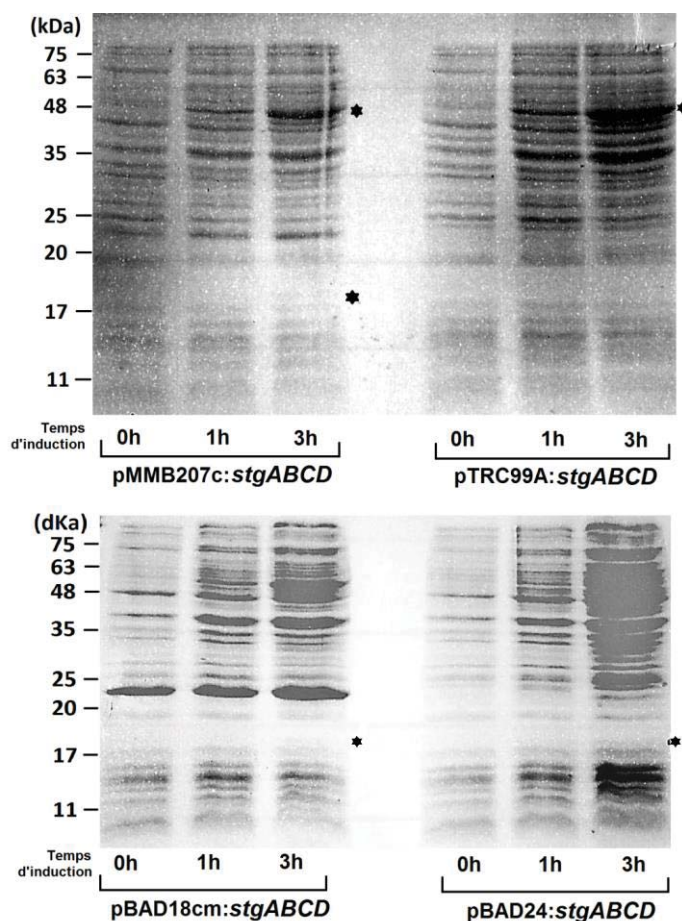


Figure 16 : Expression de l'opéron *stgABCD* dans quatre plasmides chez une souche d'*E. coli* afimbriaire (ORN172).

L'accumulation de protéines d'approximativement 18 kDa (étoile du bas) et de 45 kDa (étoile du haut) correspondant respectivement à StgA et StgD est observée. Le gel de SDS-PAGE à 15% d'acrylamide.

Surexpression de l'opéron *tcfABCD*

Le clonage et la surexpression de l'opéron *tcfABCD* a d'abord été effectuée chez *E. coli* ORN172 à l'aide des deux plasmides inducible à l'IPTG, soient pTRC99A et pMMB207c. Comme contrôle, nous avons utilisé la même souche, mais transformée avec les plasmides sans insert. Après induction de 4h et 20h, il nous a été impossible de visualiser l'accumulation de protéine susceptible de correspondre à l'expression de *tcfABCD* (Figure 17). Cependant, nous avons observé lors de la normalisation de la quantité de protéine pour ces échantillons que la croissance des souches transformées avec les plasmides comprenant *tcfABCD* était largement inhibée par rapport aux mêmes souches transformées avec les plasmides ne contenant pas cet insert (résultats non présentés).

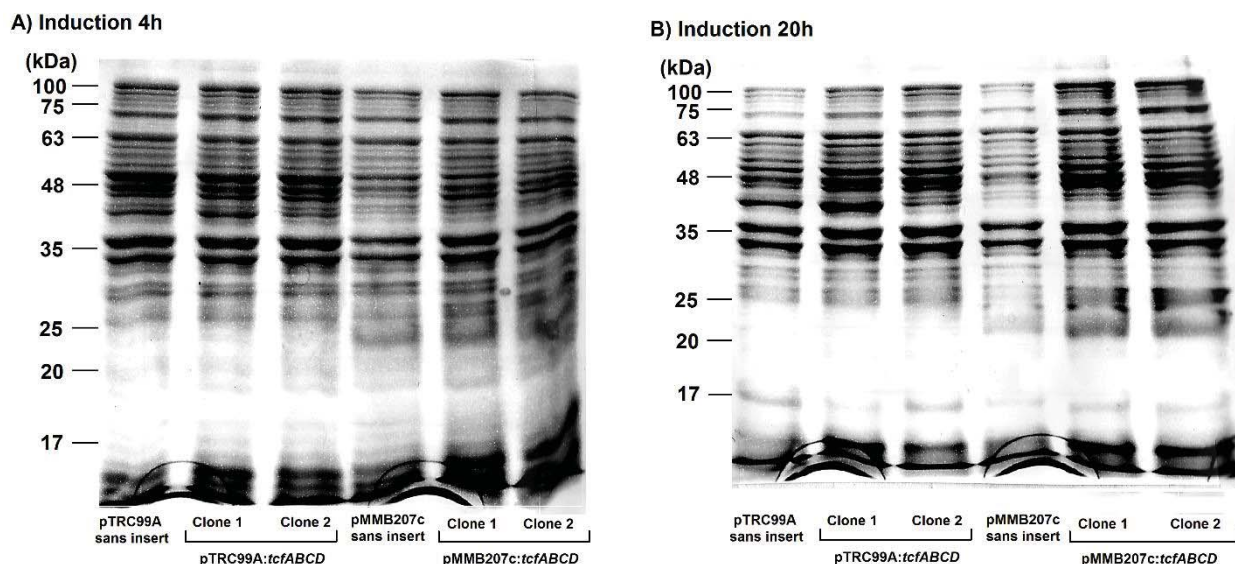


Figure 17 : Expression de l'opéron *tcfABCD* dans deux plasmides inducible à l'IPTG chez une souche d'*E. coli* afimbriaire (ORN172).

Les protéines totales de deux clones indépendants pour chacune des constructions ont été visualisées après induction de 4h (A) et 20h (B). Aucune protéine susceptible de correspondre à l'expression de *tcfABCD* n'est observable. Migration sur un gel de SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

En raison du retard de croissance subie par les souches *d'E. coli* ORN172 possédant les plasmides pMMB207c:*tcfABCD* et pTRC99A:*tcfABCD*, il nous a paru intéressant de transformer ces deux constructions chez *S. Typhi*, tant chez ISP1820 WT que chez la souche afimbriaire ISP1820 Δ 14. Nous avons répété l'induction de protéines dans les mêmes

conditions que chez ORN172. Après extraction des protéines totales et migration, nous avons observé l'accumulation d'une protéine d'environ 25 kDa chez les deux souches de *S. Typhi* possédant le plasmide pMMB207c:*tcfABCD* mais absente chez les souches de *S. Typhi* possédant le plasmide pMMB207c sans insert (Figure 18). Cette protéine pourrait correspondre à l'expression de TcfA ou TcfB, respectivement le chaperon ou la sous-unité majeure de cet opéron. L'accumulation de cette protéine est apparente tant chez la souche ISP1820 WT que chez la souche afimbriaire ISP1820 $\Delta 14$.

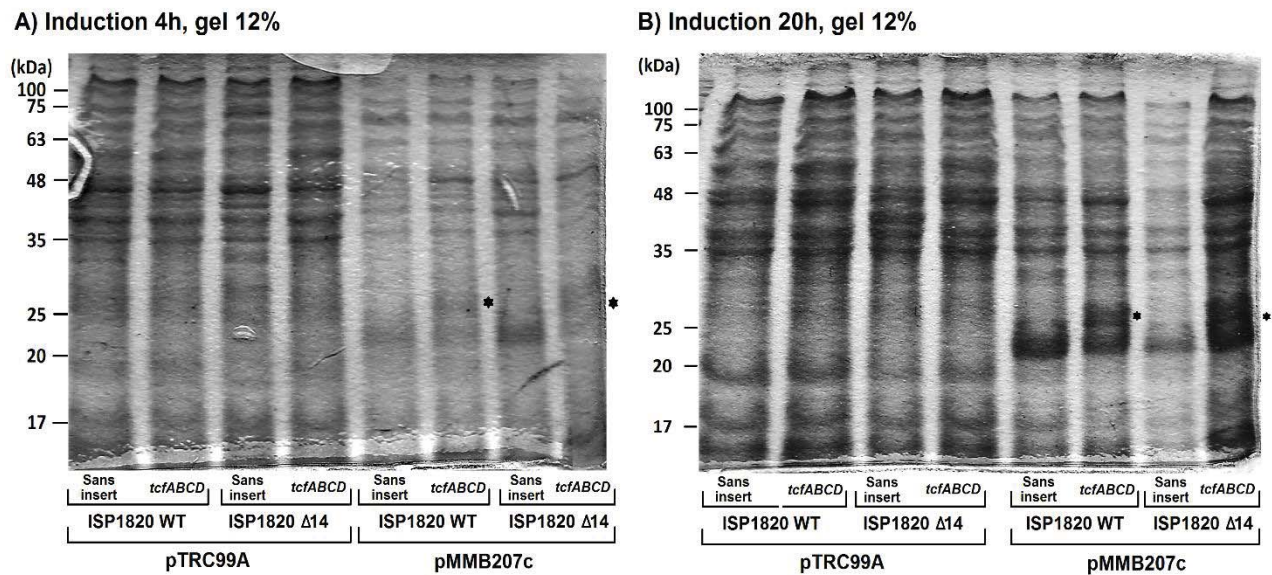


Figure 18 : Expression de l'opéron *tcfABCD* dans deux plasmides inductible à l'IPTG chez *S. Typhi* sauvage (WT) et afimbriaire ($\Delta 14$) sur gel d'acrylamide.

L'accumulation d'une protéine à environ 25 kDa est observée chez les souches de *S. Typhi* possédant le plasmide pMMB207c:*tcfABCD* (étoiles à droite des pistes) après 4h (A) et 20h (B) d'induction.

De plus, nous avons chargé les mêmes échantillons sur un gel de porosité inférieure afin de distinguer les protéines de plus grand poids moléculaire (Figure 19). De cette manière, la présence d'une protéine induite supplémentaire à environ 135 kDa a été révélée, tant chez ISP1820 sauvage que chez ISP1820 $\Delta 14$. Bien que le poids moléculaire soit un peu élevé par rapport à la prédiction, cette protéine pourrait correspondre au placier TcfC.

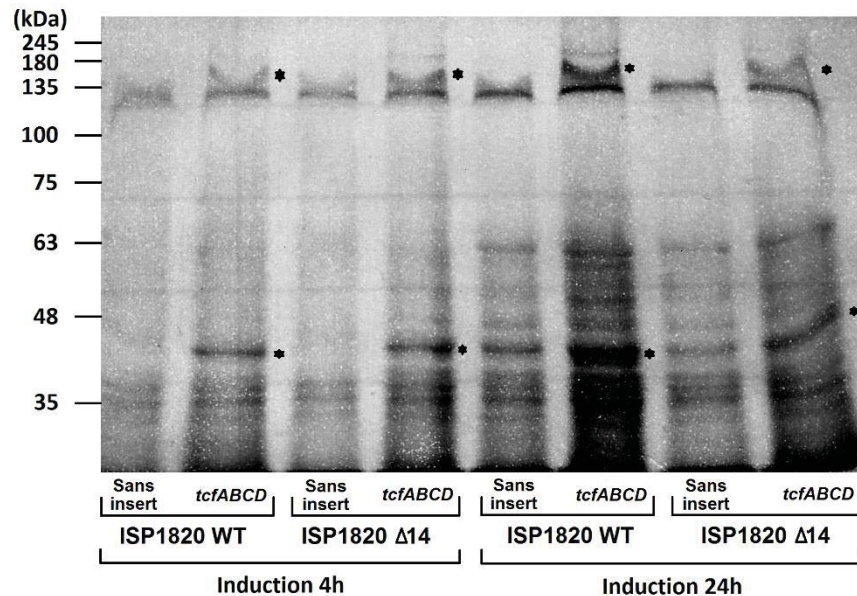


Figure 19 : Expression de l'opéron *tcfABCD* dans deux plasmides inductible à l'IPTG chez *S. Typhi* ISP1820 sauvage (WT) et afimbriaire ($\Delta 14$) sur gel de faible porosité (8%).

Les échantillons sont identiques à ceux de la figure 18. On voit l'accumulation d'une protéine d'un poids approximatif de 135 kDa pouvant correspondre à l'expression de TcfC (étoile du haut).

Expression des opérons *bcf*, *sta* et *ste*

Afin d'observer l'expression des opérons *bcfABCDEFG*, *staABCDEFG* et *steABCDEF*, ces opérons ont été introduits dans le plasmide pMMB207c puisque nous avons précédemment démontré qu'il est adéquat pour l'expression de *tcfABCD*. Ces constructions ont été transformées chez une souche afimbriaire d'*E. coli* ORN172. Les amorces utilisées pour l'amplification par *PCR* de ces opérons figurent dans le tableau III.

L'expression des opérons *bcf*, *sta* et *ste* a été induite par l'ajout d'IPTG dans une culture en phase de croissance logarithmique pendant 20 h. Un extrait de protéines totales de ces cultures a ensuite été déposé sur gel d'acrylamide. La même souche mais portant le plasmide pMMB207c sans insert a servi comme contrôle afin de distinguer les protéines induites par les opérons clonés des protéines endogènes. Aucune protéine exogène n'a été visualisée chez deux clones indépendants, dans le cas de ces trois opérons (Figure 20 et tableau IV). De plus, aucun défaut de croissance n'a été observé par mesure de la densité optique suite à l'ajout de l'inducteur.

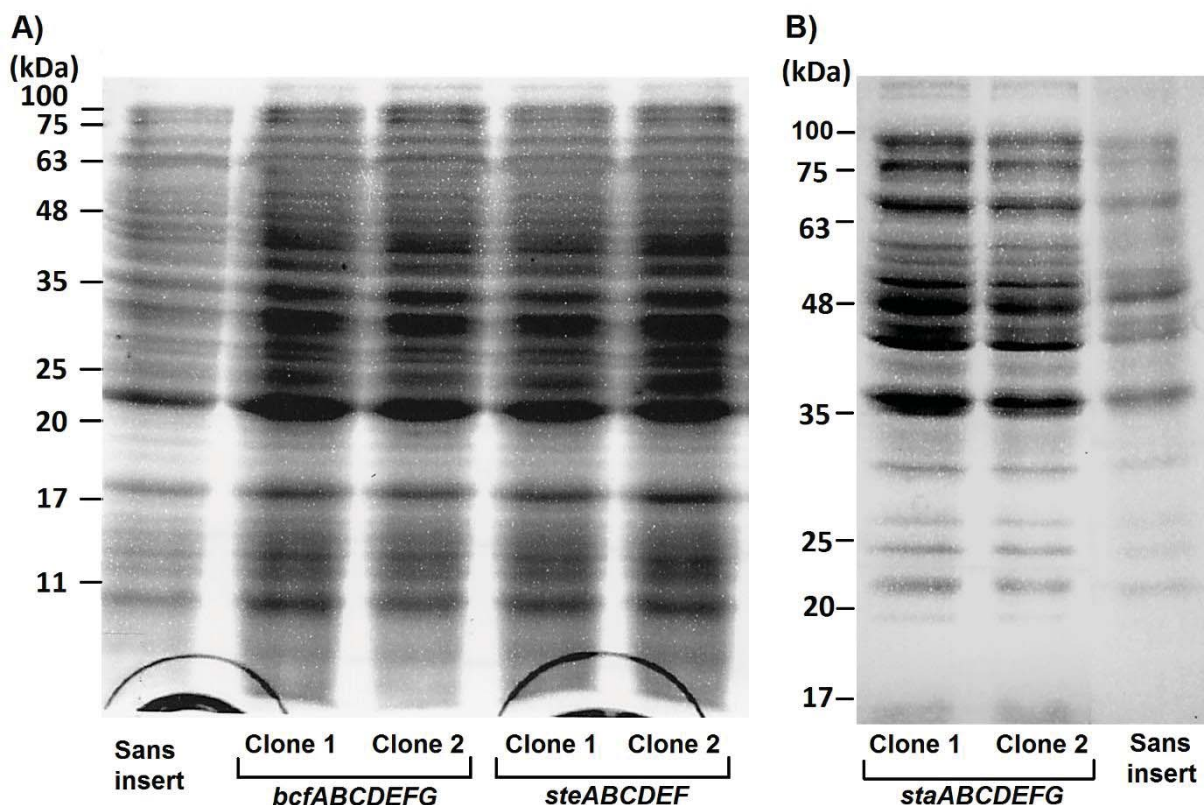


Figure 20 : Expression des opérons *bcfABCDEF*, *steABCDEF* et *staABCDEF* chez une souche d'*E. coli* afimbriaire (ORN172).

Aucune protéine exogène ne semble s'accumuler chez deux clones indépendants pour chacun des opérons *bcf*, *ste* (A) et *sta* (B). Migration sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

En somme, nous avons construit des plasmides d'expression pour huit différents opérons fimbriaires de *S. Typhi* et transformé ces constructions chez une souche afimbriaire d'*E. coli*. Chez ces souches, nous avons observé l'accumulation d'au moins une protéine pouvant correspondre à l'expression des opérons *stg*. De plus, un retard de croissance important était observé lors de la normalisation de la concentration en protéines avant de charger les échantillons bactériens portant le plasmide contenant l'opéron *tcf*, suggérant que la surexpression de *tcf* avait un effet létal chez *E. coli*. Nous avons poursuivi l'investigation en transformant le plasmide contenant cet opéron chez une souche de *S. Typhi* afimbriaire. Ceci nous a permis de visualiser l'accumulation d'une protéine pouvant correspondre à l'expression de *tcfA*.

Observation microscopique du fimbria Tcf

Afin d'observer si la surexpression de l'opéron *tcfABCD* pouvait permettre l'assemblage de structures fimbriaires, nous avons soumis des échantillons de culture bactériennes de *E. coli* et de *S. Typhi* afimbriaires portant le vecteur d'expression pMMB207c à une observation directe par microscopie électronique à transmission. Lorsque l'opéron *tcfABCD* est présent chez *E. coli*, de fines structures extracellulaires sont assemblées sur toute la surface externe des bactéries. À l'opposé, de telles structures ne sont pas observées chez cette souche afimbriaire portant le plasmide pMMB207c ne contenant pas d'insert (Figure 21).

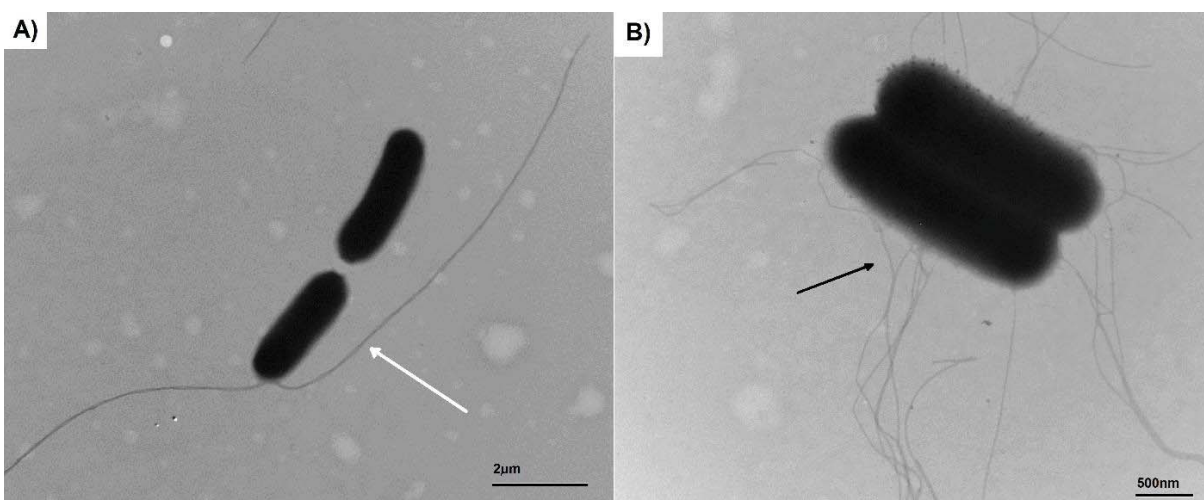


Figure 21 : Observation du fimbria *tcf* chez une souche afimbriaire d'*E. coli* ORN172 par microscopie électronique à transmission.

A) La souche contenant le plasmide pMMB207c sans insert a servi comme contrôle négatif de la présence de fimbriae. On observe seulement des flagelles (flèche blanche). B) La souche contenant l'opéron *tcfABCD* produit des structures extracellulaires à l'apparence de fimbriae (flèche noire) après 24h d'induction en bouillon.

L'observation de la souche de *S. Typhi* portant pMMB207c sans insert en microscopie électronique démontre l'absence de fimbriae (Figure 22A). L'expression de *tcfABCD* mène à la production de longs fimbriae (Figure 22B) semblables à ceux observés avec le même vecteur d'expression chez notre souche d'*E. coli* afimbriaire.

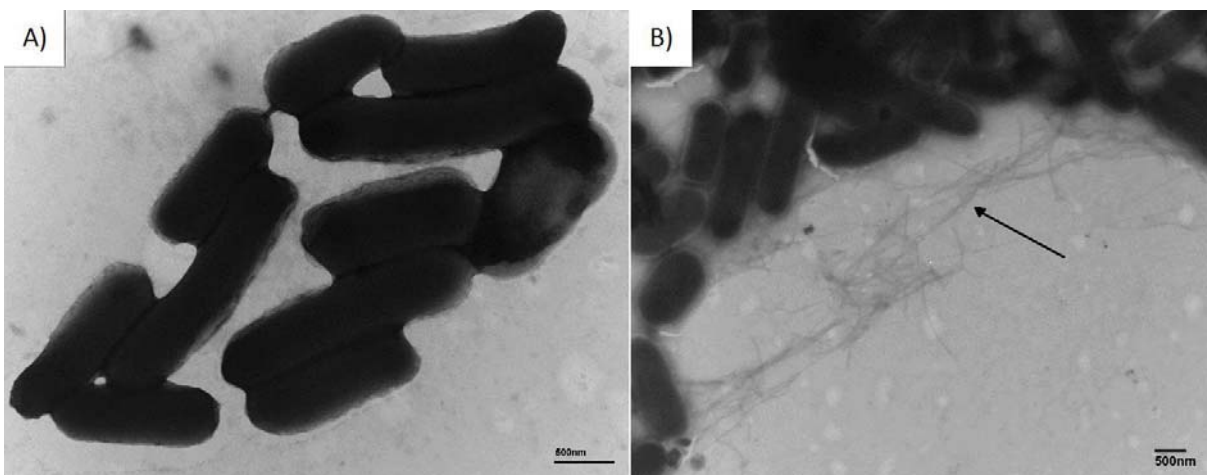


Figure 22 : Observation du fimbria Tcf chez une souche afimbriaire de *S. Typhi* par microscopie électronique à transmission.

A) La souche contenant le plasmide pMMB207c sans insert a servi comme contrôle. B) La souche contenant l'opéron *tcfABCD* produit des structures extracellulaires à l'apparence de fimbriae (flèche noire).

Cette étude est la première à documenter par observation directe l'expression d'un opéron fimbriaire retrouvé chez *S. Typhi*. La confirmation visuelle de l'assemblage de *tcf* chez ces souches ouvre la voie pour étudier le rôle de ce fimbria lors de l'interaction de ces bactéries avec des cellules de l'hôte.

Effet de la surexpression sur la croissance et production de protéines fimbriaires

La souche afimbriaire d'*E. coli* ainsi que celle de *S. Typhi* exprimant le fimbria *tcf* constituent des outils tout désignés pour effectuer des essais d'adhésion dans un modèle d'interaction hôte-pathogène *in vitro*. Cependant, puisqu'un défaut de croissance a été associé à la surexpression de ce fimbria, nous avons d'abord cherché des conditions dans lesquelles cet effet est minimal afin de diminuer l'impact que cela pourrait avoir sur l'interprétation des essais d'adhésion.

Les courbes de croissance ont été déterminées chez une même souche en présence ou absence de l'agent inducteur (IPTG) par mesure de la densité optique des cultures ainsi que par compte d'unités viables dans les conditions expérimentales ayant permis de confirmer la surexpression de l'opéron *tcfABCD*.

D'abord, nous n'observons aucun défaut de croissance chez la souche de *S. Typhi* portant un plasmide de surexpression ne contenant aucun insert puisque l'ajout d'IPTG ne retarde pas la croissance de la souche (figure 23A). Cependant, la surexpression de *tcfABCD* provoque une inhibition de croissance que l'on constate tant en termes de réduction du nombre d'unités formatrice de colonies (UFC) et de turbidité des cultures après 4h, ainsi qu'après 24h suivant l'ajout de l'IPTG (figure 23B). Ce retard de croissance a également été observé avec la souche d'*E. coli* afimbriaire exprimant *tcfABCD* lorsque nous devons normaliser la quantité de protéines chargées sur les gels de protéines totales selon la turbidité des cultures (données non présentées).

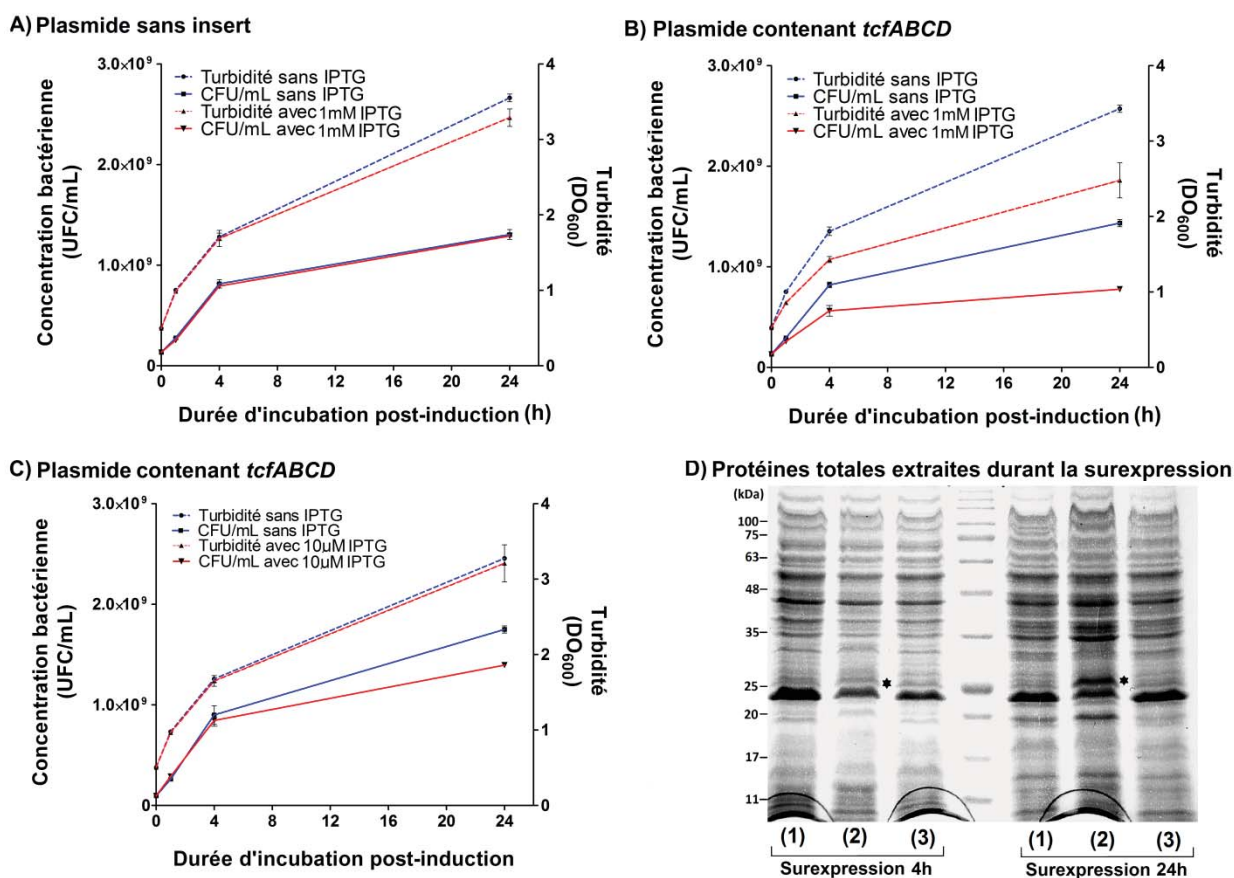


Figure 23 : Inhibition de croissance provoquée par la surexpression de l'opéron *tcfABCD* chez une souche afimbriaire de *S. Typhi*.

Courbes de croissances en termes d'UFC et de turbidité selon la durée d'incubation après l'ajout de l'IPTG. A-C) Les courbes de croissance ont été effectuées en duplicatas biologiques et sont présentés en termes de moyenne \pm SD. D) Séparation des protéines totales extraites des cultures ayant servies à déterminer les courbes de croissance : 1) Plasmide sans insert en présence d'IPTG à 1mM, 2) Plasmide avec insert *tcfABCD* en présence d'IPTG à 1mM, 3) Plasmide avec insert *tcfABCD* en présence d'IPTG à 10μM.

Afin d'éliminer ce défaut de croissance, nous avons tenté d'abaisser la concentration d'IPTG utilisée de 1mM à 10µM. Nous avons à nouveau établis des courbes de croissance et en parallèle procéder à une séparation des protéines totales extraites des mêmes cultures sur gel d'acrylamide. Dans ces conditions, l'ajout d'IPTG ne retarde plus la croissance (figure 23C) mais l'expression de *tcfABCD* n'a pas pu être visualisée (figure 23D), bien que notre contrôle d'expression à 1mM révèle l'accumulation d'une protéine pouvant correspondre à TcfA, faible après 4h mais très évidente après 24h de culture. Nous avons également observé un retard de croissance similaire lorsque les bactéries étaient cultivées à 30°C plutôt qu'à 37°C (données non présentées).

Ces quelques essais d'optimisation n'ont pas diminué le retard de croissance observé pendant la surexpression de *tcf* observé à partir de 4h post-induction. Cependant, ce retard de croissance n'est pas observé après la première heure de surexpression. Nous avons par conséquent utilisé des cultures induites pendant une heure afin d'effectuer des expériences d'interaction avec des cellules humaines *in vitro*.

Essais d'adhésion

L'un des modèles classiques d'interaction hôte-pathogène *in vitro* consiste à effectuer un essai d'adhésion où on mesure la quantité de bactéries récupérées suite à plusieurs lavages après un temps de co-culture déterminé avec des cellules épithéliales adhérentes. La lignée de cellules épithéliales utilisée dans nos essais (INT-407) est issue d'un segment d'intestin d'un embryon humain et a été utilisée pour modéliser la barrière épithéliale intestinale.

Nous avons donc comparé la capacité d'adhésion des deux souches bactériennes (*E. coli* et *S. Typhi*) surexprimant l'opéron *tcfABCD* au sein du vecteur d'expression inductible à l'IPTG (pMMB207c) à des souches isogéniques portant le même plasmide d'expression mais sans insert. De plus, *tcfABCD* cloné sur un plasmide où l'opéron est sous le contrôle de son promoteur d'origine (plasmide pWSK29, provenant d'une étude précédente dans notre laboratoire) a aussi été utilisé. Nous avons décidé d'intégrer ces souches à nos essais puisque dans les mêmes conditions de culture, le promoteur natif de *tcfABCD* démontre un certain

niveau d'activité (Figure 12). Nous avons limité nos tests à ces souches en raison de notre incapacité à visualiser l'expression des autres opérons sur gel de protéines totales. Nous avons également exclu l'opéron *stg* car le placier est classé comme pseudogène, ce qui diminue l'intérêt de chercher un phénotype associé à son expression.

Chez *S. Typhi*, lorsque l'expression de *tcfABCD* est sous le contrôle de son promoteur d'origine, nous n'observons aucune différence significative au niveau de la capacité d'adhésion dans les conditions expérimentales utilisées (figure 24A). Cependant, la surexpression de *tcfABCD* mène à une réduction d'approximativement un ordre de grandeur dans le nombre de bactéries récupérées à la fin des essais, ce qui se traduit par une baisse équivalente en termes de pourcentage, passant de 12% à 1% (figure 24B).

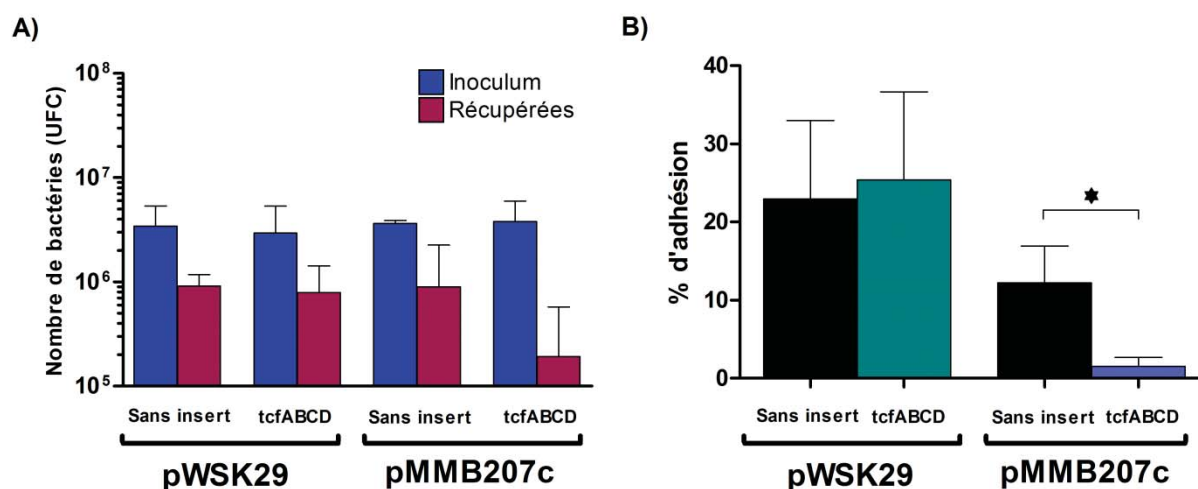


Figure 24 : Capacité d'adhésion d'une souche afimbriaire de *S. Typhi* modulée par l'expression de l'opéron *tcfABCD*.

L'opéron *tcfABCD* est porté sur un plasmide où son expression est contrôlée par le promoteur d'origine (pWSK29) ou par un promoteur inductible (pMMB207c). Les données représentent au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata techniques et sont présentées en terme de moyenne \pm SD. A) Quantité de bactéries inoculées ou récupérées après l'essai d'adhésion. B) Les données sont représentées en terme de pourcentage de bactéries récupérées par rapport à l'inoculum initial.

Bien que l'accumulation de TcfA n'ait pas été observée chez notre souche d'*E. coli* afimbriaire, des structures ressemblant à des fimbriae ont été directement observés suite à la surexpression. Nous avons donc aussi tenté d'effectuer les essais d'adhésion chez cette souche. Chez *E. coli*, lorsque l'expression de *tcfABCD* est sous le contrôle de son promoteur

d'origine, nous n'observons pas de différence de capacité d'adhésion significative (figure 25). Cependant, lorsque l'expression de *tcfABCD* est contrôlée par un promoteur inducible à l'IPTG, nous observons une réduction de la capacité d'adhésion similaire à celle observée chez *S. Typhi* (figure 24).

Ainsi donc, la surexpression de l'opéron *tcfABCD* mène à une réduction de la capacité d'adhésion de bactéries afimbriaires, tant chez *S. Typhi* qu'une espèce non pathogène utilisée couramment en laboratoire.

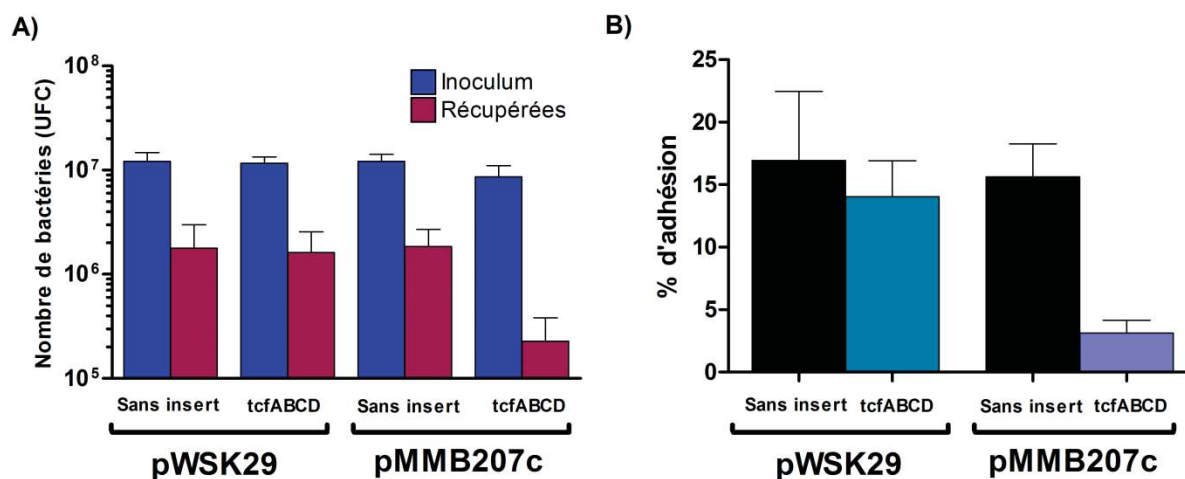


Figure 25 : Capacité d'adhésion d'une souche afimbriaire d'*E. coli* modulée par l'expression de l'opéron *tcfABCD*.

L'opéron *tcfABCD* est porté sur un plasmide où son expression est contrôlée par le promoteur d'origine (pWSK29) ou par un promoteur inducible (pMMB207c). Les données représentent au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata techniques et sont présentées en terme de moyenne \pm SD. A) Quantité de bactéries inoculées ou récupérées après l'essai d'adhésion. B) Les données sont représentées en terme de pourcentage de bactéries récupérées par rapport à l'inoculum initial.

Discussion

Les manifestations cliniques de la fièvre typhoïde sont bien connues mais les déterminants génétiques contribuant à sa pathogenèse sont encore mal compris. De plus, la restriction du spectre d'hôtes de *S. Typhi* à l'Homme contrairement à la vaste majorité des autres salmonelles n'est que partiellement expliquée. L'évolution de ce pathogène a été marquée par une perte de fonction de nombreux gènes mais également par l'acquisition d'un répertoire de systèmes d'adhésion unique. Puisque l'adhésion aux cellules d'un hôte est une étape critique dans l'établissement d'une infection, l'étude de ces systèmes d'adhésion s'avère essentielle.

Par homologie de séquence, le génome de *S. Typhi* contiendrait quatorze systèmes d'adhésion fimbriaires dont douze de type FCP, un curli ainsi qu'un pili de type IV. La majeure partie des informations disponibles sur ces gènes a été acquise en étudiant d'autres bactéries, particulièrement *E. coli* et *S. Typhimurium*. Très peu d'informations sont disponibles sur l'expression et la fonction biologique de ces systèmes chez *S. Typhi*.

Cette présente étude a utilisé une approche de génie génétique afin de fournir de nouvelles informations sur ces systèmes d'adhésion putatifs, particulièrement en ce qui a trait aux FCP. Deux axes de recherche ont été investigués. D'abord, l'expression de ces systèmes d'adhésion dans différentes conditions a été évaluée par l'utilisation de gènes rapporteurs (Gfp et β -galactosidase). De plus, le clonage de certains des opérons entiers sous le contrôle d'un promoteur inductible a permis la surexpression d'au moins un des fimbriae, l'opéron *tcf*. Ceci a également permis l'observation directe d'un fimbria par microscopie électronique ainsi que les premières études fonctionnelles d'un fimbria cloné de *S. Typhi*.

Profil d'expression des fimbriae

Nous avons cloné la région promotrice des 14 systèmes d'adhésion fimbriaires putatifs de *S. Typhi* dans un plasmide multicopies en amont du gène *lacZ*. Cette fusion transcriptionnelle a permis un criblage rapide, peu coûteux, sensible et quantitatif du niveau d'expression de ces systèmes dans plusieurs conditions expérimentales en les introduisant dans une souche afimbriaire et non pathogène d'*E. coli*.

Nous avons comme hypothèse que l'expression des fimbriae de *S. Typhi* serait régulée par la disponibilité en fer libre ainsi que par la richesse du milieu de culture. Nous avons donc comparé le niveau d'expression des systèmes d'adhésion en milieu minimal pauvre et riche en fer libre ainsi qu'en milieu LB classique (Figure 11). L'expression des fimbriae *bcf* et *csg* est favorisée en milieu pauvre en fer. Chez *S. Typhimurium*, l'expression de l'opéron *csg* survient lors d'une carence en fer (Romling *et al.* 1998), ce qui est cohérent avec nos observations chez *S. Typhi*. L'expression d'autres fimbriae tels CFA/I et LPF chez *E. coli* est également induite lorsque la quantité de fer est limitante (Torres *et al.* 2007, Haines *et al.* 2015). Tel qu'observé chez ces deux entérobactéries, nos propres observations appuient l'effet d'une carence en fer dans la surexpression de fimbriae chez *S. Typhi*. Inversement, trois des systèmes d'adhésion putatifs (*saf*, *stc* et *std*) ont tendance à être exprimés à un niveau plus élevé en milieu minimal en présence de fer mais cette différence ne fût pas significative. L'expression des autres opérons n'apparaît pas modifiée par la présence de fer en milieu minimal.

Le fer est un cofacteur impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles la réplication de l'ADN, la motilité ainsi que l'expression de nombreux facteurs de virulence (Andrews *et al.* 2003). La protéine Fur est considérée comme l'un des régulateurs d'expression global chez les salmonelles et son activité est intimement lié à l'homéostasie du fer (Osman et Cavet 2011). L'analyse bioinformatique des régions promotrices des 14 systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi* suggère des sites de liaison de *fur* dans les opérons *csg*, *stc* et *std* (Annexe 1). Il serait judicieux d'évaluer le niveau d'expression de ces gènes chez un mutant *fur* afin d'appuyer son implication dans leur régulation. L'évaluation de l'expression de *bcf* chez un mutant *fur* serait également judicieuse puisqu'une carence en fer a provoqué une surexpression

de cet opéron en milieu minimal. Il pourrait s'agir d'une régulation indirecte par *fur* puisque cette région promotrice ne comprend pas de site de liaison pour ce régulateur.

L'analyse des promoteurs a prédit de nombreux sites de liaison pour d'autres régulateurs dont les mutants chez la souche à l'étude sont disponibles (Annexe 1). De la même manière que pour *fur*, l'évaluation du niveau d'expression des opérons fimbriaires chez d'autres mutants pourrait permettre d'appuyer l'implication de ces régulateurs.

Nous avons identifiés un site de liaison potentiel pour FlhCD dans la région promotrice de l'opéron *stc*. Ce régulateur est impliqué dans la transition entre la phase sessile et motile (Martinez-Antonio *et al.* 2008). Or, l'expression de fimbriae est fréquemment associée à l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte et donc à la phase sessile.

Par ailleurs, notre analyse suggère que les promoteurs des opérons *csg*, *std* et *ste* contiennent un site de liaison pour PhoB. Ce facteur de transcription est activé lors d'une carence en phosphate (Blanco *et al.* 2002). Il a été démontré que PhoB est surexprimé chez *S. Typhimurium* lors de leur survie dans des vacuoles de macrophages, une étape rencontrée au cours de la pathogenèse de ce sérovar (Eriksson *et al.* 2003). Cette même étude a également remarqué une baisse d'expression du fimbria de type I et une surexpression de deux autres fimbriae, *csg* et *pef*. Le régulateur PhoB pourrait être un régulateur essentiel à l'expression de certains fimbriae pendant la survie intracellulaire de *S. Typhi* dans les macrophages.

Nous avons également comparé le niveau d'expression des fimbriae entre un milieu pauvre et d'un milieu riche en nutriments. Afin d'exclure le rôle du fer, nous avons comparé entre le milieu LB riche (contenant du fer) avec le milieu minimal M63 supplémenté à une concentration en fer non limitante (Figure 11). On remarque que les opérons *bcf*, *csg*, *pil* et *sef* sont exprimés plus fortement en milieu pauvre qu'en milieu riche. Inversement, l'expression de *stc* et *sth* est inférieure en milieu pauvre. La variation du niveau d'expression ne suivant pas la même dynamique pour tous les fimbriae étudiés implique des mécanismes de régulation distincts. Ceci suggère des dynamiques d'expression et donc des rôles hétérogènes lors de la pathogenèse de *S. Typhi* chez l'humain.

On retrouve plusieurs exemples de fimbriae dont l'expression est liée à la disponibilité en nutriments dans la littérature. Chez *S. Typhimurium*, l'expression de *csg* est favorisée en milieu pauvre en nutriments (White *et al.* 2008, Castelijns *et al.* 2012). À l'inverse, le fimbria

K99 d'*E. coli* est réprimé par l'ajout d'une faible concentration d'alanine ou de leucine (Klemm 1994). Les voies de signalisation par lesquelles cet effet est observé sont malheureusement incomplètes et doivent être décrites avec plus de finesse afin de mieux comprendre les raisons sous-jacentes à l'expression de ces systèmes d'adhésion putatifs.

Nous avons également évalué l'expression des systèmes d'adhésion putatifs dans des cultures statiques. Aucun fimbria n'est surexprimé en milieu sans agitation par rapport à une culture avec agitation. Au contraire, l'expression de tous les opérons étudiés est inférieure en culture statiques par rapport aux cultures avec agitation à l'exception de *bcf*, *csg* et *std* pour lesquels le niveau d'expression n'est pas significativement différent. Ceci suggère qu'une diminution de la tension en oxygène ou l'absence d'un stress mécanique ne sont pas des signaux suffisants pour provoquer l'expression des systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi* dans nos conditions de culture.

La dernière condition expérimentale étudiée consistant à laisser croître les bactéries sur un milieu LB supplémenté d'agar afin de donner une matrice solide favorable à une interaction au sein d'une colonie bactérienne. En comparaison avec le milieu LB avec agitation, seul l'opéron *saf* est significativement surexprimé. Cette condition est somme toute peu favorable à l'expression des systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi*.

Nous avons voulu valider que cette approche nous procurait des informations pertinentes sur la dynamique d'expression chez *S. Typhi*. Nous avons ainsi choisi deux promoteurs qui répondaient de manière opposée à la présence de fer chez *E. coli* (*csg* et *std*) et confirmé que cette dynamique d'expression est conservée chez *S. Typhi* sauvage (Figure 14). Bien que l'activité de ces promoteurs soit supérieure chez *S. Typhi* par rapport à *E. coli*, nous observons que leur dynamique d'expression est similaire. Une étude récente a comparé l'expression de gènes orthologues entre *S. Typhimurium* et *E. coli* et il a été observé qu'environ le trois quart des gènes possédant une séquence en acides aminés identique étaient régulés de façon similaire (Meysman *et al.* 2013). La classe fonctionnelle dont l'expression est corrélée le plus fortement entre ces deux espèces est constituée de gènes de biosynthèse de composants structuraux dont les fimbriae font partie. Ces études soutiennent l'idée d'utiliser *E. coli* comme modèle d'étude pour l'expression des fimbriae.

Dans l'ensemble, les résultats fournis par les rapporteurs β -galactosidase nous permettent de conclure que les 14 systèmes d'adhésion putatifs sont exprimés, bien que certains le soient à un niveau très faible. Les deux opérons les plus fortement exprimés quel que soit la condition de culture sont *sef* et *sth*. Les plus grandes différences d'expression sont observées entre le milieu minimal avec et sans fer, provoquant une surexpression d'environ deux fois en carence de fer pour *bcf* et pour *csg*. La dynamique d'expression est différente selon le fimbria étudié, suggérant des rôles distincts au cours de la vie de la bactérie.

Les expériences *in vitro* sont certes utiles afin de caractériser des signaux précis permettant l'expression des fimbriae. Néanmoins, un parallèle doit être fait avec des conditions rencontrées lors de la pathogenèse de *S. Typhi* chez son hôte. Certaines informations sont déjà disponibles au sujet de l'expression *in vivo* de ces systèmes d'adhésion putatifs. Une étude a comparé le niveau d'expression des gènes de *S. Typhi* dans le sang de patients au Bangladesh à celui en milieu de culture *in vitro* LB par biopuces (Sheikh *et al.* 2011). L'expression de tous les systèmes d'adhésion à l'exception de *stc* a été détectée. De plus, les gènes *pilO* et *staA* codant tous deux pour des protéines fimbriaires structurelles sont surexprimés par plusieurs ordres de grandeur dans le sang des patients par rapport aux cultures *in vitro*. Une autre étude a détecté la présence d'anticorps ciblant les protéines TcfB, StbD, CsgE, CsgF et CsgG dans le sérum de patients en convalescence suite à une infection par *S. Typhi* (Handfield et Hillman 2006). Ces informations suggèrent une implication de ces fimbriae au cours de la pathogenèse de *S. Typhi* mais ne permettent pas de connaître leurs ligands ni à quel moment ils sont exprimés au cours de l'infection.

Il pourrait être envisageable de comparer l'expression du génome de *S. Typhi* entre différents prélèvements chez des patients atteints de la fièvre typhoïde. Classiquement, cinq types de prélèvements sont envisageables : la moelle osseuse, le sang, les fèces, le frottis rectal ainsi la vésicule biliaire lors d'une ablation chez des porteurs chroniques. Une telle étude pourrait mettre en évidence à quel moment les fimbriae sont les plus exprimés, ce qui pourrait nous indiquer un rôle potentiel ou à tout le moins à quel moment ou en contact avec quel organe l'expression des fimbriae est déclenchée.

Rapporteurs fluorescents (*gfp*)

L'utilisation d'une fusion transcriptionnelle avec une protéine fluorescente permet d'évaluer quantitativement l'expression de gènes à la résolution de bactéries individuelles et ainsi déterminer si la population bactérienne sont uniformes ou comportent des sous-populations caractéristiques, comme par exemple dans le cas d'une variation de phase telle qu'observée pour d'autres fimbriae (van der Woude et Baumlér 2004). L'utilisation d'un rapporteur fluorescent ouvre également la possibilité de mesurer un niveau d'expression à l'intérieur même d'une cellule hôte, comme suite à la phagocytose par un macrophage (Gerisch et Muller-Taubenberger 2003, Humphries *et al.* 2003).

Les régions promotrices des 14 systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi* ont été clonées en amont du gène *gfp* afin d'obtenir un signal fluorescent proportionnel à l'expression de ces gènes. Nous avons cultivé nos souches en milieu LB avec aération pendant 16h, l'une des conditions utilisées dans nos essais par rapporteur β -galactosidase (Figure 11). De manière surprenante et au contraire de nos essais par dosage enzymatique, cette expérience ne nous a pas permise d'observer l'expression des fimbriae (Figure 15). Il est possible que l'expression de la GFP soit simplement trop faible pour être détectée. La GFP utilisée dans le cadre de cette étude est une version modifiée pour émettre une fluorescence améliorée comparé à la protéine sauvage (*egfp*). Il existe cependant une GFP ayant subi des modifications supplémentaires pour être plus stablement repliée (Pedelacq *et al.* 2006). L'utilisation d'une telle protéine aurait le potentiel d'améliorer notre signal. Il est également possible, bien que la présence et l'orientation du promoteur de *saf* ait été confirmée par *PCR*, que des mutations aient été introduites lors du clonage et inactivent sa fonction. Le séquençage de nos constructions permettrait de répondre à cette question. Des études subséquentes devront être menées afin de mettre au point ces outils afin d'évaluer l'expression des systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi* lors de l'interaction avec des cellules d'un hôte en culture.

Surexpression et synthèse des opérons fimbriaires

L'observation d'un phénotype conféré par le transfert de gènes dans un organisme hétérologue procure une solide démonstration de la fonction de ces gènes. Ainsi, la surexpression d'un opéron fimbriaire putatif de *S. Typhi* chez *E. coli* est en mesure de procurer une solide démonstration que ces gènes sont responsable et suffisants pour la synthèse d'un fimbria.

La surexpression des opérons *bcf*, *sta*, *ste*, *stg* et *tcf* a été tentée chez une souche d'*E. coli* afimbriaire non invasive couramment utilisée pour exprimer des fimbriae exogènes. Afin de confirmer la production de protéines à partir de ces opérons, une électrophorèse sur gel d'acrylamide des protéines totales extraites des cultures bactériennes a été effectuée sur des échantillons après 4h et 24h en présence de l'agent inducteur. Nous avons observé l'accumulation de protéines de poids moléculaire pouvant correspondre à StgA et StgD suite à l'expression de *stgABCD* ainsi que de TcfC et TcfD suite à l'expression de *tcfABCD*. L'accumulation de protéines de d'autres opérons n'a pas été observée. Il est possible que ces autres opérons soient exprimés malgré notre incapacité à détecter leur production par électrophorèse. L'absence d'accumulation évidente de protéines exogènes pour les plasmides d'expression de *bcf*, *sta* et *ste* pourrait être due à la faible sensibilité de la coloration au bleu de Coomassie. Il est également possible que cette accumulation ait été masquée par des protéines abondantes endogènes. Une extraction des protéines de surface pourrait permettre une plus grande sensibilité. La détection de ces protéines par immunobuvardage pourrait être envisagée si des anticorps étaient rendus disponibles. De plus,

Essais d'adhésion aux cellules épithéliales

Les interactions hôte-pathogène font appel à une panoplie de mécanismes qui sont de mieux en mieux décrits au niveau moléculaire. L'expression de facteurs d'adhésion et plus spécifiquement de fimbriae confère aux bactéries la capacité de coloniser tout un éventail de tissus biologiques ou de surfaces abiotiques (Baumler et Fang 2013, Pan *et al.* 2014). L'étude de ces mécanismes est à la base du développement de nouvelles stratégies de contrôle

microbiologique ainsi que de l'élaboration d'approches thérapeutiques. Le deuxième volet de cette étude a cherché à attribuer un rôle aux systèmes d'adhésion putatifs retrouvés chez *S. Typhi*.

Nos expériences ont mis en évidence une baisse de la capacité d'adhésion d'une souche afimbriaire d'*E. coli* surexprimant l'opéron *tcf* (Figure 25). Ce phénotype est associé à l'apparition de structures fimbriaires à la surface de la bactérie. Ces structures ont également été observées en surexprimant *tcf* chez une souche afimbriaire de *S. Typhi* (Figure 24). Nous avons également observé une forte association bactérie-bactérie sur les photos de microscopie électronique dans les cultures de *S. Typhi* surexprimant *tcf*. Il est possible que la diminution de la capacité d'adhésion due à *tcf* soit causée par une plus grande association entre bactéries, ce qui limite la surface membranaire disponible à une interaction avec les cellules épithéliales. Selon ces constatations, il est probable que l'expression de *tcf* favorise la formation de biofilms.

Une étude rapportait que la délétion de la sous-unité majeure *tcfA* n'affecte pas la capacité de *S. Typhi* (souche BRD948) à adhérer à des cellules épithéliales humaines polarisées (T84) ou non polarisées (INT-407) lors d'essais *in vitro* effectués à 4°C (Bishop *et al.* 2008). Ceci pourrait être expliqué par une redondance fonctionnelle de plusieurs systèmes d'adhésion. La surexpression de systèmes d'adhésion putatifs chez d'une souche afimbriaire dans le cadre de notre étude permet de limiter cette complémentarité fonctionnelle, bien que d'autres systèmes d'adhésion cryptiques soient présents (Korea *et al.* 2010). Fait intéressant, une autre étude effectuée dans notre laboratoire a rapporté une augmentation de la capacité d'adhésion chez un mutant Δtcf dans une autre souche de *S. Typhi* (ISP1820, David 2012). Les conclusions divergentes de ces deux études antérieures sont probablement dues aux conditions expérimentales des essais d'adhésion.

Nous n'avons pas entrepris d'essais d'adhésion suite à la surexpression des autres opérons clonés par notre incapacité à confirmer que la synthèse de protéines fimbriaires avait bel et bien lieu (Figure 20). Cependant, d'autres études publiées rapportent l'observation de fimbriae par microscopie électronique suite à la surexpression d'opérons fimbriaires exogènes malgré qu'ils aient été incapables d'observer l'accumulation de protéines sur gel de polyacrylamide

(Korea *et al.* 2010, Felek *et al.* 2011). Il serait judicieux de confirmer la présence de fimbriae par microscopie suite à la surexpression des autres fimbriae putatifs clonés (*bcf*, *saf*, *sta*, *stb*, *stg* et *sth*). Cependant, trois de ces opérons contiennent des codons d'arrêt prématurés dans au moins un gène considéré comme essentiel dans l'assemblage d'un FCP. Le placier des opérons *bcf* et *stg* contient un ou plusieurs codons d'arrêt prématurés (Tableau IV). Le gène codant pour la sous-unité majeure de *sth* est également considérée comme pseudogène en raison d'un codon d'arrêt prématuré. Les opérons clonés les plus intéressants à étudier au niveau fonctionnel sont donc *saf*, *sta* et *stb*. L'opéron *saf* est particulièrement intéressant en raison de son fort niveau d'expression en milieu LB (Figure 11). Deux autres FCP putatifs dont les séquences semblent coder pour des protéines fonctionnelles seraient intéressantes à étudier pour ces mêmes raisons, soient *stc* et *std*.

Conclusion et perspectives

Cette présente étude avait pour objectif de démontrer que les 14 systèmes d'adhésion fimbriaires annotés dans le génome de *Salmonella enterica* sérovar Typhi sont fonctionnels et jouent un rôle dans l'interaction hôte-pathogène de cette bactérie avec l'être humain. Ce projet de recherche est présenté en deux volets.

Dans un premier volet, nous avons évalué le niveau d'expression de ces systèmes d'adhésion dans différentes conditions à l'aide de fusions transcriptionnelles. Nous avons détecté l'expression de tous les systèmes d'adhésion étudiés. La plupart sont exprimés à un faible niveau, peu importe la condition expérimentale. Trois d'entre eux sont systématiquement plus exprimés que les autres, soient *saf*, *stc* et *sth*. L'expression des opérons *bcf* et *csg* est favorisée pendant une carence en fer, un élément nutritif essentiel retrouvé en quantité limitante chez l'hôte. L'expression de plusieurs opérons, particulièrement *std*, est favorisée par une culture sur milieu solide. Il est intéressant de constater que l'expression des différents systèmes d'adhésion étudiés est favorisée dans certaines conditions plutôt que d'autres, suggérant des rôles à des moments différents au cours de la pathogenèse de *S. Typhi*.

Dans un second volet, nous avons forcé la surexpression de plusieurs opérons fimbriaires chez une souche afimbriaire d'*E. coli* et de *S. Typhi*. La synthèse de protéines de l'opéron *tcf* a été détectée. En plus, cette étude est la première à observer l'apparition de structures fimbriaires issues de l'expression de *tcfABCD* par microscopie électronique. Un essai d'adhésion à des cellules épithéliales intestinales humaines en cultures *in vitro* a permis de mettre en évidence une réduction de la capacité d'adhésion suite à la surexpression de *tcf*. Cette observation est corrélée à une plus grande association entre bactéries, comme en atteste nos observations en microscopie électronique. Il est possible que *tcf* promeuve la formation de biofilms, situation rencontrée chez les porteurs chroniques de la fièvre typhoïde.

Cette étude a également permis l'élaboration d'outils qui pourront servir à étudier plus amplement les systèmes d'adhésion putatifs de *S. Typhi*. Il serait judicieux d'utiliser les fusions transcriptionnelles avec le gène *lacZ* pour mesurer le niveau d'expression des

différents opérons fimbriaires putatifs chez des mutants des différents régulateurs suggérés par notre analyse bioinformatique des régions promotrices. La mise au point d'un rapporteur fluorescent *GFP* pourrait également permettre de mesurer un niveau d'expression pendant l'interaction avec différentes cellules de l'hôte dans des essais *in vitro*. Finalement, l'élaboration d'anticorps spécifiques pour les fimbriae putatifs à l'étude pourrait permettre de confirmer la synthèse de ces protéines par immunobuvardage. De tels anticorps pourraient être couplés à des billes d'or pour les identifier par microscopie électronique.

Dans l'ensemble, cette étude a procuré des évidences appuyant que certains systèmes d'adhésion identifiés par analyse de séquence chez *S. Typhi* sont fonctionnels. Des études plus approfondies sur leur implication de ces fimbriae dans l'interaction hôte-pathogène de cette bactérie pourraient permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales.

Bibliographie

- Abgottspon, D. et B. Ernst** (2012). "In vivo evaluation of FimH antagonists - a novel class of antimicrobials for the treatment of urinary tract infection." Chimia **66**(4): 166-169.
- Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements et B. I. Eisenstein** (1985). "An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**(17): 5724-5727.
- Agnandji, S. T., B. Lell, S. S. Soulanoudjingar, J. F. Fernandes, B. P. Abossolo, et al.** (2011). "First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children." N. Engl. J. Med. **365**(20): 1863-1875.
- Allen, W. J., G. Phan, S. J. Hultgren et G. Waksman** (2013). "Dissection of Pilus Tip Assembly by the FimD Usher Monomer." J. Mol. Biol. **425**(5): 958-967.
- Allen, W. J., G. Phan et G. Waksman** (2012). "Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens." Curr. Opin. Struct. Biol. **22**(4): 500-506.
- Althouse, C., S. Patterson, P. Fedorka-Cray et R. E. Isaacson** (2003). "Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*." Infect. Immun. **71**(11): 6446-6452.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers et D. J. Lipman** (1990). "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. **215**(3): 403-410.
- Amann, E., B. Ochs et K. J. Abel** (1988). "Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*." Gene **69**(2): 301-315.
- Aminov, R. I.** (2011). "Horizontal gene exchange in environmental microbiota." Front. Microbiol. **2**: 158.
- Anderson, T. F.** (1949). "On the mechanism of adsorption of bacteriophages on host cells." Symp. Soc. gen. Microbiol. **1**(76).
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones** (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol. Rev. **27**(2-3): 215-237.
- Arpaia, N., J. Godec, L. Lau, K. E. Sivick, L. M. McLaughlin, et al.** (2011). "TLR signaling is required for *Salmonella* Typhimurium virulence." Cell **144**(5): 675-688.
- Arutyunov, D. et L. S. Frost** (2013). "F conjugation: back to the beginning." Plasmid **70**(1): 18-32.
- Asai, Y., Y. Ohyama, K. Gen et T. Ogawa** (2001). "Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2." Infect. Immun. **69**(12): 7387-7395.
- Avery, O. T., C. M. Macleod et M. McCarty** (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type III." J. Exp. Med. **79**(2): 137-158.
- Baga, M., M. Norgren et S. Normark** (1987). "Biogenesis of *E. coli* Pap pili: *papH*, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation." Cell **49**(2): 241-251.
- Baga, M., S. Normark, J. Hardy, P. O'Hanley, D. Lark, et al.** (1984). "Nucleotide sequence of the *papA* gene encoding the Pap pilus subunit of human uropathogenic *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **157**(1): 330-333.

- Baturo, A. P., A. V. Kaliaev et V. P. Raginskaia** (1971). "[Fimbriae in bacteria of the *Citrobacter* genus]." Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. **48**(1): 46-48.
- Baumler, A. et F. C. Fang** (2013). "Host specificity of bacterial pathogens." Cold Spring Harb. Perspect. Med. **3**(12): a010041.
- Baumler, A. J.** (1997). "The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*." Trends Microbiol. **5**(8): 318-322.
- Baumler, A. J., R. M. Tsolis et F. Heffron** (1996). "The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**(1): 279-283.
- Bhan, M. K., R. Bahl et S. Bhatnagar** (2005). "Typhoid and paratyphoid fever." Lancet **366**(9487): 749-762.
- Bishop-Hurley, S. L., P. J. Rea et C. S. McSweeney** (2010). "Phage-displayed peptides selected for binding to *Campylobacter jejuni* are antimicrobial." Protein Eng. Des. Sel. **23**(10): 751-757.
- Bishop-Hurley, S. L., F. J. Schmidt, A. L. Erwin et A. L. Smith** (2005). "Peptides selected for binding to a virulent strain of *Haemophilus influenzae* by phage display are bactericidal." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(7): 2972-2978.
- Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R. A. Kingsley, et al.** (2008). "Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion." Microbiology **154**(Pt 7): 1914-1926.
- Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth et M. Coll** (2002). "Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator." Structure **10**(5): 701-713.
- Blomfield, I. C., M. S. McClain et B. I. Eisenstein** (1991). "Type 1 fimbriae mutants of *Escherichia coli* K12: characterization of recognized afimbriate strains and construction of new fim deletion mutants." Mol. Microbiol. **5**(6): 1439-1445.
- Brachman, P. et E. Abrutyn** (2009). Bacterial Infections of Humans. New York, Springer, 1620.
- Buckle, G. C., C. L. Walker et R. E. Black** (2012). "Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010." J. Glob. Health **2**(1): 010401.
- Burrows, L. L.** (2012). "Pseudomonas aeruginosa twitching motility: type IV pili in action." Annu. Rev. Microbiol. **66**: 493-520.
- Busch, A., G. Phan et G. Waksman** (2015). "Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly." Philos Trans A Math Phys Eng Sci. **373**(2036).
- Busch, A. et G. Waksman** (2012). "Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism." Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **367**(1592): 1112-1122.
- Capoor, M. R., D. Nair, J. Posti, S. Singhal, M. Deb, et al.** (2009). "Minimum inhibitory concentration of carbapenems and tigecycline against *Salmonella* spp." J. Med. Microbiol. **58**(Pt 3): 337-341.
- Castelijn, G. A., S. van der Veen, M. H. Zwietering, R. Moezelaar et T. Abee** (2012). "Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium." Biofouling **28**(1): 51-63.
- Center for Disease Control** (1994). "Typhoid Immunisation - Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices." **43**.

- Chen, J., K. S. de Felipe, M. Clarke, H. Lu, O. R. Anderson, et al.** (2004). "Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa." Science **303**(5662): 1358-1361.
- Chessa, D., M. G. Winter, S. P. Nuccio, C. Tukel et A. J. Baumler** (2008). "RosE represses Std fimbrial expression in Salmonella enterica serotype Typhimurium." Mol. Microbiol. **68**(3): 573-587.
- Chopra, S. et J. Reader** (2014). "tRNAs as Antibiotic Targets." Int. J. Mol. Sci. **16**(1): 321-349.
- Chorell, E., J. S. Pinkner, C. Bengtsson, S. Edvinsson, C. K. Cusumano, et al.** (2012). "Design and synthesis of fluorescent pilicides and curlicides: bioactive tools to study bacterial virulence mechanisms." Chemistry (Easton) **18**(15): 4522-4532.
- Clegg, S. et J. K. Pierce** (1983). "Organization of genes responsible for the production of mannose-resistant fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* isolate." Infect. Immun. **42**(3): 900-906.
- CNRS-Aix-Marseille.** (2013). "AmpliFX." Retrieved consulté septembre 2013, from <http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX?lang=en>.
- Coetzee, J. N. et G. Pernet** (1962). "Fimbriae and haemagglutinating properties in strains of Proteus." Nature **196**: 497-498.
- Crawford, R. W., T. Wangdi, A. M. Spees, M. N. Xavier, R. M. Tsolis, et al.** (2013). "Loss of very-long O-antigen chains optimizes capsule-mediated immune evasion by *Salmonella enterica* serovar Typhi." mBio **4**(4).
- Crespo, M. D., C. Puorger, M. A. Scharer, O. Eidam, M. G. Grutter, et al.** (2012). "Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC." Nat. Chem. Biol. **8**(8): 707-713.
- Crump, J. A., S. P. Luby et E. D. Mintz** (2004). "The global burden of typhoid fever." Bull. World Health Organ. **82**(5): 346-353.
- Dadachova, E. et A. Casadevall** (2006). "Treatment of infection with radiolabeled antibodies." Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging **50**(3): 193-204.
- Dadachova, E. et A. Casadevall** (2014). "Radiolabeled antibodies for therapy of infectious diseases." Microbiol Spectr. **2**(6): 0023.
- Danne, C. et S. Dramsi** (2012). "Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization." Res. Microbiol. **163**(9-10): 645-658.
- David, É.** (2012). Caractérisation et délétion de tous les systèmes d'adhésion connus de Salmonella enterica sérovar Typhi. Maîtrise, Université de Montréal.
- Day, C. J., J. Tiralongo, R. D. Hartnell, C. A. Logue, J. C. Wilson, et al.** (2009). "Differential carbohydrate recognition by *Campylobacter jejuni* strain 11168: influences of temperature and growth conditions." PLoS One **4**(3): e4927.
- De Oliveira, D. C., A. Fernandes Junior, R. Kaneno, M. G. Silva, J. P. Araujo Junior, et al.** (2014). "Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material." Foodborne Pathog. Dis. **11**(6): 478-483.
- Deng, L., J. Song, X. Gao, J. Wang, H. Yu, et al.** (2014). "Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen *Salmonella* Typhi." Cell **159**(6): 1290-1299.
- Deng, W., S. R. Liou, G. Plunkett, 3rd, G. F. Mayhew, D. J. Rose, et al.** (2003). "Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18." J. Bacteriol. **185**(7): 2330-2337.

- Desai, P. T., S. Porwollik, F. Long, P. Cheng, A. Wollam, et al.** (2013). "Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies." mBio **4**(2).
- Di Yu, X., A. Dubnovitsky, A. F. Pudney, S. Macintyre, S. D. Knight, et al.** (2012). "Allosteric mechanism controls traffic in the chaperone/usher pathway." Structure **20**(11): 1861-1871.
- Dorman, C. J. et C. P. Corcoran** (2009). "Bacterial DNA topology and infectious disease." Nucleic Acids Res. **37**(3): 672-678.
- Dougan, G. et S. Baker** (2014). "*Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever." Annu. Rev. Microbiol. **68**: 317-336.
- Dove, S. L. et C. J. Dorman** (1994). "The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling." Mol. Microbiol. **14**(5): 975-988.
- Duguid, J. P.** (1959). "Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains." J. Gen. Microbiol. **21**: 271-286.
- Duguid, J. P. et I. Campbell** (1969). "Antigens of the type-1 fimbriae of *salmonellae* and other enterobacteria." J. Med. Microbiol. **2**(4): 535-553.
- Duguid, J. P., I. W. Smith, G. Dempster et P. N. Edmunds** (1955). "Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*." J. Pathol. Bacteriol. **70**(2): 335-348.
- Dunger, G., C. R. Guzzo, M. O. Andrade, J. B. Jones et C. S. Farah** (2014). "*Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV Pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence." Mol. Plant. Microbe Interact. **27**(10): 1132-1147.
- Edsall, G., S. Gaines, M. Landy, W. D. Tigertt, H. Sprinz, et al.** (1960). "Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*." J. Exp. Med. **112**: 143-166.
- Effa, E. E. et H. Bukirwa** (2011) "Azithromycin for treating uncomplicated typhoid and paratyphoid fever (enteric fever)." Cochrane Database of Systematic Reviews DOI: 10.1002/14651858.CD006083.pub3.
- Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen et J. C. Hinton** (2003). "Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*." Mol. Microbiol. **47**(1): 103-118.
- Evans, M. L. et M. R. Chapman** (2014). "Curli biogenesis: order out of disorder." Biochim. Biophys. Acta **1843**(8): 1551-1558.
- Farabaugh, P. J.** (1996). "Programmed translational frameshifting." Microbiol. Rev. **60**(1): 103-134.
- Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland et F. Daigle** (2006). "Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **103**(6): 1906-1911.
- Felek, S., J. J. Jeong, L. M. Runco, S. Murray, D. G. Thanassi, et al.** (2011). "Contributions of chaperone/usher systems to cell binding, biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence." Microbiology **157**(Pt 3): 805-818.
- Feng, L., P. R. Reeves, R. Lan, Y. Ren, C. Gao, et al.** (2008). "A recalibrated molecular clock and independent origins for the cholera pandemic clones." PLoS One **3**(12): e4053.
- Feng, Y., K. Y. Chien, H. L. Chen et C. H. Chiu** (2012). "Pseudogene recoding revealed from proteomic analysis of *salmonella* serovars." J. Proteome Res. **11**(3): 1715-1719.

- Feng, Y., R. N. Johnston, G. R. Liu et S. L. Liu** (2013). "Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction." PLoS One **8**(3): e59427.
- Ferrieres, L. et D. J. Clarke** (2003). "The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface." Mol. Microbiol. **50**(5): 1665-1682.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris et F. Heffron** (1986). "Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **83**(14): 5189-5193.
- Figueira, R. et D. W. Holden** (2012). "Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors." Microbiology **158**(Pt 5): 1147-1161.
- Firon, N., I. Ofek et N. Sharon** (1983). "Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella* Typhimurium." Carbohydr. Res. **120**: 235-249.
- Forest, C.** (2012). Étude fonctionnelle de l'opéron fimbriaire *stg* de *Salmonella enterica* sérovar Typhi. Doctorat Thèse, Université de Montréal.
- Foster, A. D., J. D. Ingram, E. K. Leitch, K. R. Lennard, E. L. Osher, et al.** (2015). "Methods for the Creation of Cyclic Peptide Libraries for Use in Lead Discovery." J. Biomol. Screen.
- Fraser, A., E. Goldberg, C. J. Acosta, M. Paul et L. Leibovici** (2007). "Vaccines for preventing typhoid fever." Cochrane Database Syst Rev(3): CD001261.
- Freitag, C. S. et B. I. Eisenstein** (1983). "Genetic mapping and transcriptional orientation of the *fimD* gene." J. Bacteriol. **156**(3): 1052-1058.
- Fronzes, R., H. Remaut et G. Waksman** (2008). "Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria." EMBO J. **27**(17): 2271-2280.
- Gaind, R., B. Paglietti, M. Murgia, R. Dawar, S. Uzzau, et al.** (2006). "Molecular characterization of ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A causing enteric fever in India." J. Antimicrob. Chemother. **58**(6): 1139-1144.
- Gal-Mor, O., E. C. Boyle et G. A. Grassl** (2014). "Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ." Front. Microbiol. **5**: 391.
- Galan, J. E.** (2001). "*Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **17**: 53-86.
- Galyov, E. E., A. V. Karlishev, T. V. Chernovskaya, D. A. Dolgikh, O. Smirnov, et al.** (1991). "Expression of the envelope antigen F1 of *Yersinia pestis* is mediated by the product of *cafIM* gene having homology with the chaperone protein PapD of *Escherichia coli*." FEBS Lett. **286**(1-2): 79-82.
- Ganesan, V., B. N. Harish, G. A. Menezes et S. C. Parija** (2014). "Detection of *Salmonella* in Blood by PCR using *iroB* gene." J. Clin. Diagn. Res. **8**(11): DC01-03.
- Geer, L. Y., A. Marchler-Bauer, R. C. Geer, L. Han, J. He, et al.** (2010). "The NCBI BioSystems database." Nucleic Acids Res. **38**(Database issue): D492-496.
- Geibel, S. et G. Waksman** (2014). "The molecular dissection of the chaperone-usher pathway." Biochim. Biophys. Acta **1843**(8): 1559-1567.

Gerisch, G. et A. Muller-Taubenberger (2003). "GFP-fusion proteins as fluorescent reporters to study organelle and cytoskeleton dynamics in chemotaxis and phagocytosis." Methods Enzymol. **361**: 320-337.

Gerstel, U. et U. Romling (2003). "The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium." Res. Microbiol. **154**(10): 659-667.

Gesteland, R. F. et J. F. Atkins (1996). "Recoding: dynamic reprogramming of translation." Annu. Rev. Biochem. **65**: 741-768.

Glynn, J. R. et S. R. Palmer (1992). "Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak." Am. J. Epidemiol. **136**(11): 1369-1377.

Gong, J., J. Zhang, M. Xu, C. Zhu, Y. Yu, et al. (2014). "Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry *Salmonella* isolates in China (2006 to 2012)." Appl. Environ. Microbiol. **80**(2): 687-693.

Gonzalez-Escobedo, G. et J. S. Gunn (2013). "Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage." Infect. Immun. **81**(8): 2920-2930.

Goodenough, U. et R. P. Levine (1974). Genetics. New York, Holt, Reinhart and Wilson, Inc.

Grimont, P. A. D. et F. X. Weill (2007). "Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars." WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella* (9th ed.).

Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson et J. Beckwith (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J. Bacteriol. **177**(14): 4121-4130.

Hahn, E., P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, et al. (2002). "Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili." J. Mol. Biol. **323**(5): 845-857.

Haines, S., N. Arnaud-Barbe, D. Poncet, S. Reverchon, J. Wawrzyniak, et al. (2015). "IscR regulates synthesis of CFA/I fimbriae in response to iron starvation in Enterotoxigenic *Escherichia coli*." J. Bacteriol.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**(4): 557-580.

Handfield, M. et J. D. Hillman (2006). "*In vivo* induced antigen technology (IVIAT) and change mediated antigen technology (CMAT)." Infect. Disord. Drug Targets **6**(3): 327-334.

Haneda, T., S. E. Winter, B. P. Butler, R. P. Wilson, C. Tukel, et al. (2009). "The capsule-encoding *viaB* locus reduces intestinal inflammation by a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism." Infect. Immun. **77**(7): 2932-2942.

Hannan, T. J., M. Totsika, K. J. Mansfield, K. H. Moore, M. A. Schembri, et al. (2012). "Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection." FEMS Microbiol. Rev. **36**(3): 616-648.

Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." Curr. Opin. Microbiol. **4**(2): 172-177.

Harish, B. N. et G. A. Menezes (2015). "Determination of antimicrobial resistance in *Salmonella* spp." Methods Mol. Biol. **1225**: 47-61.

Harris, J. B., A. Baresch-Bernal, S. M. Rollins, A. Alam, R. C. LaRocque, et al. (2006). "Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi." Infect. Immun. **74**(9): 5161-5168.

Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, et al. (2001). "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12." DNA Res. **8**(1): 11-22.

- Heijden, J. v. d., E. S. Bosman, L. A. Reynolds et B. B. Finlay** (2015). "Direct measurement of oxidative and nitrosative stress dynamics in *Salmonella* inside macrophages." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **112**(2): 560-565.
- Heiman, M.** (1997). "Webcutter2." Retrieved Septembre 2013, from <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>.
- Hendrickx, A. P., J. M. Budzik, S. Y. Oh et O. Schneewind** (2011). "Architects at the bacterial surface - sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds." Nat. Rev. Microbiol. **9**(3): 166-176.
- Hoffman, S. L., N. H. Punjabi, R. C. Rockhill, A. Sutomo, A. R. Rivai, et al.** (1984). "Duodenal string-capsule culture compared with bone-marrow, blood, and rectal-swab cultures for diagnosing typhoid and paratyphoid fever." J. Infect. Dis. **149**(2): 157-161.
- Holt, K. E., N. R. Thomson, J. Wain, G. C. Langridge, R. Hasan, et al.** (2009). "Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi." BMC Genomics **10**: 36.
- Hone, D. M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan et M. M. Levine** (1991). "Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*." Vaccine **9**(11): 810-816.
- House, D., A. Bishop, C. Parry, G. Dougan et J. Wain** (2001). "Typhoid fever: pathogenesis and disease." Curr. Opin. Infect. Dis. **14**(5): 573-578.
- Houwink, A. L. et v. W. Iterson** (1950). "Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation." Biochim. Biophys. Acta **5**(1): 10-44.
- Huang, G. T., S. K. Haake, J. W. Kim et N. H. Park** (1998). "Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection." Oral Microbiol. Immunol. **13**(5): 301-309.
- Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew et S. Falkow** (1981). "Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate." Infect. Immun. **33**(3): 933-938.
- Humphries, A. D., M. Raffatellu, S. Winter, E. H. Weening, R. A. Kingsley, et al.** (2003). "The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons." Mol. Microbiol. **48**(5): 1357-1376.
- Issenhuth-Jeanjean, S., P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, et al.** (2014). "Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme." Res. Microbiol. **165**(7): 526-530.
- Jakomin, M., D. Chessa, A. J. Baumler et J. Casadesus** (2008). "Regulation of the *Salmonella enterica* *std* fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR." J. Bacteriol. **190**(22): 7406-7413.
- Jass, J., S. Schedin, E. Fallman, J. Ohlsson, U. J. Nilsson, et al.** (2004). "Physical properties of *Escherichia coli* P pili measured by optical tweezers." Biophys. J. **87**(6): 4271-4283.
- Jean, S. S. et P. R. Hsueh** (2011). "High burden of antimicrobial resistance in Asia." Int. J. Antimicrob. Agents **37**(4): 291-295.
- Jones, B. D., N. Ghori et S. Falkow** (1994). "*Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches." J. Exp. Med. **180**(1): 15-23.

- Jones, C. H., J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, A. V. Nicholes, et al.** (1995). "FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**(6): 2081-2085.
- Kauffmann, F.** (1941). "Die Bakteriologie der *Salmonella*-Gruppe." J. Am. Med. Ass. **8**(117): 658.
- Kaur, H., M. Ahmad et V. Scaria** (2015). "Computational analysis and *In-silico* predictive modeling for inhibitors of PhoP regulon in *S. typhi* on high-throughput screening bioassay dataset." Interdiscip. Sci.
- Khanal, M., F. Larssonneur, V. Raks, A. Barras, J. S. Baumann, et al.** (2015). "Inhibition of type 1 fimbriae-mediated *Escherichia coli* adhesion and biofilm formation by trimeric cluster thiomannosides conjugated to diamond nanoparticles." Nanoscale **7**(6): 2325-2335.
- Kidgell, C., U. Reichard, J. Wain, B. Linz, M. Torpdahl, et al.** (2002). "*Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old." Infect. Genet. Evol. **2**(1): 39-45.
- Klein, T., D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, et al.** (2010). "FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infections: from design and synthesis to *in vitro* and *in vivo* evaluation." J. Med. Chem. **53**(24): 8627-8641.
- Klemm, P.** (1981). "The complete amino-acid sequence of the K88 antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*." Eur. J. Biochem. **117**(3): 617-627.
- Klemm, P.** (1982). "Primary structure of the CFA1 fimbrial protein from human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains." Eur. J. Biochem. **124**(2): 339-348.
- Klemm, P.** (1984). "The *fimA* gene encoding the type-1 fimbrial subunit of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence and primary structure of the protein." Eur. J. Biochem. **143**(2): 395-399.
- Klemm, P.** (1994). Fimbriae Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines. USA, CRC Press
- Knurr, J., O. Benedek, J. Heslop, R. B. Vinson, J. A. Boydston, et al.** (2003). "Peptide ligands that bind selectively to spores of *Bacillus subtilis* and closely related species." Appl. Environ. Microbiol. **69**(11): 6841-6847.
- Kohbata, S., H. Yokoyama et E. Yabuuchi** (1986). "Cytopathogenic effect of *Salmonella* Typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study." Microbiol. Immunol. **30**(12): 1225-1237.
- Korea, C. G., R. Badouraly, M. C. Prevost, J. M. Ghigo et C. Beloin** (2010). "*Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities." Environ. Microbiol. **12**(7): 1957-1977.
- Korea, C. G., J. M. Ghigo et C. Beloin** (2011). "The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism." Bioessays **33**(4): 300-311.
- Korhonen, T. K., E. Tarkka, H. Ranta et K. Haahtela** (1983). "Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots." J. Bacteriol. **155**(2): 860-865.
- Krogfelt, K. A., H. Bergmans et P. Klemm** (1990). "Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae." Infect. Immun. **58**(6): 1995-1998.
- Krogh-Lund, G.** (1940). Undersogelser over Febris Typhoidea i Gronkand. Copenhagen.

- Kuan, L., J. N. Schaffer, C. D. Zouzas et M. M. Pearson** (2014). "Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation." J. Med. Microbiol. **63**(Pt 7): 911-922.
- Kucharzik, T., N. Lugering, K. Rautenberg, A. Lugering, M. A. Schmidt, et al.** (2000). "Role of M cells in intestinal barrier function." Ann. N. Y. Acad. Sci. **915**: 171-183.
- Kudirkiene, E., R. J. Bager, T. J. Johnson et A. M. Bojesen** (2014). "Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium* genomes." BMC Genomics **15**: 1093.
- Kuehn, M. J., J. Heuser, S. Normark et S. J. Hultgren** (1992). "P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips." Nature **356**(6366): 252-255.
- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins et L. S. Frost** (2003). "F factor conjugation is a true type IV secretion system." FEMS Microbiol. Lett. **224**(1): 1-15.
- Leclerc, J.-M.** (2014). Rôle du régulateur Fur et des petits ARN non codants RfrA et RfrB dans l'homéostasie du fer et la virulence de *Salmonella*. Doctorat Thèse, Université de Montréal.
- Ledeboer, N. A., J. G. Frye, M. McClelland et B. D. Jones** (2006). "Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEP-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium." Infect. Immun. **74**(6): 3156-3169.
- Lederberg, J.** (1947). "Gene Recombination and Linked Segregations in *Escherichia coli*." Genetics **32**(5): 505-525.
- Lee, J. W. et J. D. Helmann** (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." Biomaterials **20**(3-4): 485-499.
- Levine, M. M., R. E. Black et C. Lanata** (1982). "Precise estimation of the numbers of chronic carriers of *Salmonella* Typhi in Santiago, Chile, an endemic area." J. Infect. Dis. **146**(6): 724-726.
- Lillington, J., S. Geibel et G. Waksman** (2014). "Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili." Biochim. Biophys. Acta **1840**(9): 2783-2793.
- Liu, S. L., T. Ezaki, H. Miura, K. Matsui et E. Yabuuchi** (1988). "Intact motility as a *Salmonella* Typhi invasion-related factor." Infect. Immun. **56**(8): 1967-1973.
- Lo, A. W., K. Van de Water, P. J. Gane, A. W. Chan, D. Steadman, et al.** (2014). "Suppression of type 1 pilus assembly in uropathogenic *Escherichia coli* by chemical inhibition of subunit polymerization." J. Antimicrob. Chemother. **69**(4): 1017-1026.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, et al.** (2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **380**(9859): 2095-2128.
- MacLennan, C. A. et M. M. Levine** (2013). "Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease in Africa: current status." Expert Rev. Anti Infect. Ther. **11**(5): 443-446.
- Majowicz, S. E., J. Musto, E. Scallan, F. J. Angulo, M. Kirk, et al.** (2010). "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis." Clin. Infect. Dis. **50**(6): 882-889.
- Manjunatha, U. H. et P. W. Smith** (2014). "Perspective: Challenges and opportunities in TB drug discovery from phenotypic screening." Bioorg. Med. Chem.
- Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, et al.** (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Res. **43**(Database issue): D222-226.
- Marineli, F., G. Tsoucalas, M. Karamanou et G. Androutsos** (2013). "Mary Mallon (1869-1938) and the history of typhoid fever." Ann. Gastroenterol. **26**(2): 132-134.

- Martinez-Antonio, A., S. C. Janga et D. Thieffry** (2008). "Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network." J. Mol. Biol. **381**(1): 238-247.
- Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner et S. J. Hultgren** (2000). "Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells." EMBO J. **19**(12): 2803-2812.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, et al.** (2001). "Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2." Nature **413**(6858): 852-856.
- McCusker, M. P., E. C. Turner et C. J. Dorman** (2008). "DNA sequence heterogeneity in Fim tyrosine-integrase recombinase-binding elements and functional motif asymmetries determine the directionality of the fim genetic switch in *Escherichia coli* K-12." Mol. Microbiol. **67**(1): 171-187.
- McFarland, M. A., D. Andrzejewski, S. M. Musser et J. H. Callahan** (2014). "Platform for identification of *Salmonella* serovar differentiating bacterial proteins by top-down mass spectrometry: *S. Typhimurium* vs *S. Heidelberg*." Anal. Chem. **86**(14): 6879-6886.
- Melville, S. et L. Craig** (2013). "Type IV pili in Gram-positive bacteria." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **77**(3): 323-341.
- Mendez-Samperio, P.** (2014). "Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: current progress." Infect. Drug Resist. **7**: 229-237.
- Merselis, J. G., Jr., D. Kaye, C. S. Connolly et E. W. Hook** (1964). "Quantitative Bacteriology of the Typhoid Carrier State." Am. J. Trop. Med. Hyg. **13**: 425-429.
- Meya, D. B., S. Okurut, G. Zziwa, M. A. Rolfes, M. Kelsey, et al.** (2014). "Cellular Immune Activation in Cerebrospinal Fluid From Ugandans With Cryptococcal Meningitis and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome." J. Infect. Dis. **10**(211): 1597-1606.
- Meysman, P., A. Sanchez-Rodriguez, Q. Fu, K. Marchal et K. Engelen** (2013). "Expression divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reflects their lifestyles." Mol. Biol. Evol. **30**(6): 1302-1314.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. New York, Cold Spring Harbor, 466.
- Mohan, U., V. Mohan et R. K.** (2006). "A study of carrier state of *S. Typhi*, intestinal parasites & personal hygiene amongst food handlers in Amritsar." Indian J Comm Med(31): 60-61.
- Morris, C., C. M. Yip, I. S. Tsui, D. K. Wong et J. Hackett** (2003). "The shufflon of *Salmonella enterica* serovar Typhi regulates type IVB pilus-mediated bacterial self-association." Infect. Immun. **71**(3): 1141-1146.
- Mouslim, C. et E. A. Groisman** (2003). "Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems." Mol. Microbiol. **47**(2): 335-344.
- Mu, X. Q. et E. Bullitt** (2006). "Structure and assembly of P-pili: a protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**(26): 9861-9866.
- Mueller, C. A., P. Broz et G. R. Cornelis** (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." Mol. Microbiol. **68**(5): 1085-1095.
- Nadkarni, M. A., K. L. Chhour, C. C. Chapple, K. A. Nguyen et N. Hunter** (2014). "The profile of *Porphyromonas gingivalis* kgp biotype and *fimA* genotype mosaic in subgingival plaque samples." FEMS Microbiol. Lett. **361**(2): 190-194.

Nga, T. V., A. Karkey, S. Dongol, H. N. Thuy, S. Dunstan, et al. (2010). "The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive *Salmonella* serovars in biological specimens." BMC Infect. Dis. **10**: 125.

Nielubowicz, G. R. et H. L. Mobley (2010). "Host-pathogen interactions in urinary tract infection." Nat. Rev. Urol. **7**(8): 430-441.

Niwa, R. et M. Satoh (2015). "The Current Status and Prospects of Antibody Engineering for Therapeutic Use: Focus on Glycoengineering Technology." J. Pharm. Sci. **104**(3): 930-941.

Nizami, S. Q., Z. A. Bhutta, A. A. Siddiqui et L. Lubbad (2006). "Enhanced detection rate of typhoid fever in children in a periurban slum in Karachi, Pakistan using polymerase chain reaction technology." Scand. J. Clin. Lab. Invest. **66**(5): 429-436.

Norris, T. L. et A. J. Baumler (1999). "Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**(23): 13393-13398.

Nuccio, S. P. et A. J. Baumler (2007). "Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **71**(4): 551-575.

Nursing Standard (2015). "Reptiles kept as pets pose salmonella risk to young children." Nurs. Stand. **29**(20): 17.

Ochman, H. et E. A. Groisman (1996). "Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp." Infect. Immun. **64**(12): 5410-5412.

Onyango, D. M., S. Wandili, R. Kakai et E. N. Waindi (2009). "Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya." J Infect Dev Ctries **3**(2): 99-104.

Osman, D. et J. S. Cavet (2011). "Metal sensing in *Salmonella*: implications for pathogenesis." Adv. Microb. Physiol. **58**: 175-232.

Palomino, C., E. Marin et L. A. Fernandez (2011). "The fimbrial usher FimD follows the SurA-BamB pathway for its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **193**(19): 5222-5230.

Pan, X., Y. Yang et J. R. Zhang (2014). "Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria." Emerg. Microbes Infect. **3**(3): e23.

Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, et al. (2001). "Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18." Nature **413**(6858): 848-852.

Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White et J. J. Farrar (2002). "Typhoid fever." N. Engl. J. Med. **347**(22): 1770-1782.

Parry, C. M., L. Wijedoru, A. Arjyal et S. Baker (2011). "The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations." Expert Rev. Anti Infect. Ther. **9**(6): 711-725.

Patel, J. C. et J. E. Galan (2005). "Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry." Curr. Opin. Microbiol. **8**(1): 10-15.

Pedelacq, J. D., S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger et G. S. Waldo (2006). "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein." Nat. Biotechnol. **24**(1): 79-88.

Pinkner, J. S., H. Remaut, F. Buelens, E. Miller, V. Aberg, et al. (2006). "Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**(47): 17897-17902.

Porwollik, S. et M. McClelland (2003). "Lateral gene transfer in *Salmonella*." Microbes Infect **5**(11): 977-989.

Prajapat, M. K. et S. Saini (2012). "Interplay between Fur and HNS in controlling virulence gene expression in *Salmonella* Typhimurium." Comput. Biol. Med. **42**(11): 1133-1140.

Pratap, C. B., G. Kumar, S. K. Patel, V. K. Shukla, K. Kumar, et al. (2014). "Mix-infection of *S. Typhi* and ParaTyphi A in Typhoid Fever and Chronic Typhoid Carriers: A Nested PCR Based Study in North India." J. Clin. Diagn. Res. **8**(11): DC09-14.

Pratt, L. A. et R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." Mol. Microbiol. **30**(2): 285-293.

Prouty, A. M., W. H. Schwesinger et J. S. Gunn (2002). "Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp." Infect. Immun. **70**(5): 2640-2649.

Puorger, C., M. Vetsch, G. Wider et R. Glockshuber (2011). "Structure, folding and stability of FimA, the main structural subunit of type 1 pili from uropathogenic *Escherichia coli* strains." J. Mol. Biol. **412**(3): 520-535.

Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, et al. (2002). "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants." Infect. Immun. **70**(5): 2249-2255.

Raffatellu, M., R. L. Santos, D. Chessa, R. P. Wilson, S. E. Winter, et al. (2007). "The capsule encoding the *viaB* locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi." Infect. Immun. **75**(9): 4342-4350.

Rani, N., P. Vajpayee, S. Bhatti, S. Singh, R. Shanker, et al. (2014). "Quantification of *Salmonella* Typhi in water and sediments by molecular-beacon based qPCR." Ecotoxicol. Environ. Saf. **108**: 58-64.

Rao, C. V. S., E. De Waelheyns, A. Economou et J. Anne (2014). "Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway." Biochim. Biophys. Acta **1843**(8): 1762-1783.

Ravan, H. et R. Yazdanparast (2013). "Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly minimize the instrument needed for detection process." Anal. Biochem. **439**(2): 102-108.

Razinkov, V. I., M. J. Treuheit et G. W. Becker (2015). "Accelerated Formulation Development of Monoclonal Antibodies (mAbs) and mAb-Based Modalities: Review of Methods and Tools." J. Biomol. Screen.

Remaut, H., R. J. Rose, T. J. Hannan, S. J. Hultgren, S. E. Radford, et al. (2006). "Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism." Mol. Cell **22**(6): 831-842.

Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat. Immunol. **2**(4): 361-367.

Romani, A. A., M. C. Baroni, S. Taddei, F. Ghidini, P. Sansoni, et al. (2013). "*In vitro* activity of novel *in silico*-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens." J. Pept. Sci. **19**(9): 554-565.

Romero, D. (2013). "Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*." Res. Microbiol. **164**(7): 788-798.

Romling, U. (2005). "Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*." Cell. Mol. Life Sci. **62**(11): 1234-1246.

Romling, U., W. D. Sierralta, K. Eriksson et S. Normark (1998). "Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter." Mol. Microbiol. **28**(2): 249-264.

Rose, R. J., T. S. Welsh, G. Waksman, A. E. Ashcroft, S. E. Radford, et al. (2008). "Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly revealed in atomic detail by molecular dynamics." J. Mol. Biol. **375**(4): 908-919.

Sabbagh, S. C., C. Lepage, M. McClelland et F. Daigle (2012). "Selection of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library." PLoS One **7**(5): e36643.

Sainath Rao, S., K. V. Mohan et C. D. Atreya (2013). "A peptide derived from phage display library exhibits antibacterial activity against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS One **8**(2): e56081.

Salyers, A. A. (1993). "Gene transfer in the mammalian intestinal tract." Curr. Opin. Biotechnol. **4**(3): 294-298.

Sambrook, J. et M. R. Green (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2028.

Sathyamoorthy, N., J. M. Decker, A. P. Sherblom et A. Muchmore (1991). "Evidence that specific high mannose structures directly regulate multiple cellular activities." Mol. Cell. Biochem. **102**(2): 139-147.

Schilling, J. D., M. A. Mulvey et S. J. Hultgren (2001). "Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections." J. Infect. Dis. **183 Suppl 1**: S36-40.

Sheikh, A., R. C. Charles, N. Sharmeen, S. M. Rollins, J. B. Harris, et al. (2011). "*In vivo* expression of *Salmonella enterica* serotype Typhi genes in the blood of patients with typhoid fever in Bangladesh." PLoS Negl. Trop. Dis. **5**(12): e1419.

Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki et H. Ishikawa (2000). "Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS." Nature **407**(6800): 81-86.

Sigauque, B., A. Roca, I. Mandomando, L. Morais, L. Quinto, et al. (2009). "Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique." Pediatr. Infect. Dis. J. **28**(2): 108-113.

Simons, R. W., F. Houman et N. Kleckner (1987). "Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions." Gene **53**(1): 85-96.

Singh, P. et S. T. Cole (2011). "Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity." Future Microbiol. **6**(1): 57-71.

Snyder, H., H. He, H. Owen, C. Hanna et S. Forst (2011). "Role of Mrx fimbriae of *Xenorhabdus nematophila* in competitive colonization of the nematode host." Appl. Environ. Microbiol. **77**(20): 7247-7254.

Softberry Inc. (2015). "bprom." Consulté septembre 2013, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>.

Solov'eva, T. F., O. D. Novikova et O. Y. Portnyagina (2012). "Biogenesis of beta-barrel integral proteins of bacterial outer membrane." Biochemistry (Mosc.) **77**(11): 1221-1236.

Spano, S., X. Liu et J. E. Galan (2011). "Proteolytic targeting of Rab29 by an effector protein distinguishes the intracellular compartments of human-adapted and broad-host *Salmonella*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**(45): 18418-18423.

Stathopoulos, C., D. R. Hendrixson, D. G. Thanassi, S. J. Hultgren, J. W. St Geme, 3rd, et al. (2000). "Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story." Microbes Infect **2**(9): 1061-1072.

Steven, A. C., M. E. Bisher, B. L. Trus, D. Thomas, J. M. Zhang, et al. (1986). "Helical structure of *Bordetella pertussis* fimbriae." J. Bacteriol. **167**(3): 968-974.

Stromberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, et al. (1990). "Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4 Gal-containing isoreceptors." EMBO J. **9**(6): 2001-2010.

Stull, T. L., P. M. Mendelman, J. E. Haas, M. A. Schoenborn, K. D. Mack, et al. (1984). "Characterization of *Haemophilus influenzae* type b fimbriae." Infect. Immun. **46**(3): 787-796.

Tang, K. et X. H. Zhang (2014). "Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy." Mar. Drugs **12**(6): 3245-3282.

Thiem, V. D., F. Y. Lin, G. Canh do, N. H. Son, D. D. Anh, et al. (2011). "The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines." Clin. Vaccine Immunol. **18**(5): 730-735.

Tillotson, G. S. et N. Theriault (2013). "New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance." F1000prime Rep. **5**: 51.

Tinker, J. K. et S. Clegg (2000). "Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Infect. Immun. **68**(6): 3305-3313.

Tonetti, M. S., M. A. Imboden, L. Gerber, N. P. Lang, J. Laissue, et al. (1994). "Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections." Infect. Immun. **62**(9): 4005-4014.

Toobak, H., I. Rasooli, D. Talei, A. Jahangiri, P. Owlia, et al. (2013). "Immune response variations to *Salmonella enterica* serovar Typhi recombinant porin proteins in mice." Biologicals **41**(4): 224-230.

Torres, A. G., L. Milflores-Flores, J. G. Garcia-Gallegos, S. D. Patel, A. Best, et al. (2007). "Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7." Int. J. Med. Microbiol. **297**(3): 177-185.

Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, et al. (2001). "*Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences." Infect. Immun. **69**(5): 2894-2901.

Troxell, B. et H. M. Hassan (2013). "Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria." Front. Cell. Infect. Microbiol. **3**: 59.

Turner, A. K., S. Nair et J. Wain (2006). "The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Typhi by accumulation of point mutations in the topoisomerase targets." J Antimicrob. Chemother. **58**(4): 733-740.

U. S. Food and Drug Administration (2013). Vivotif Package Insert USA. U.S.A., Food and Drug Administration.

U. S. Food and Drug Administration (2014). Typhoid Vi Polysaccharide Vaccine Typhim Vi. U.S.A., Food and Drug Administration.

Vala, S., U. Shah, S. A. Ahmad, D. Scolnik et M. Glatstein (2014). "Resistance Patterns of Typhoid Fever in Children: A Longitudinal Community-Based Study." Am. J. Ther. **Epub ahead of printing.**

Vallet, I., J. W. Olson, S. Lory, A. Lazdunski et A. Filloux (2001). "The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**(12): 6911-6916.

van der Woude, M. W. et A. J. Baumler (2004). "Phase and antigenic variation in bacteria." Clin. Microbiol. Rev. **17**(3): 581-611, table of contents.

Vassiliadis, P., E. Pateraki et G. Politi (1966). "[Essay on the antigens and antibodies of *Shigella fimbriae*]." Ann. Soc. Belges Med. Trop. Parasitol. Mycol. **46**(3): 281-287.

Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, et al. (1999). "Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes." Nature **401**(6755): 804-808.

Verger, D., E. Miller, H. Remaut, G. Waksman et S. Hultgren (2006). "Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic *Escherichia coli*." EMBO reports **7**(12): 1228-1232.

Vetsch, M., C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E. U. Weber-Ban, et al. (2004). "Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst." Nature **431**(7006): 329-333.

Vogelsang, T. M. et J. Boe (1948). "Temporary and chronic carriers of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi B." J. Hyg. (Lond.) **46**(3): 252-261.

Wain, J., R. S. Hendriksen, M. L. Mikoleit, K. H. Keddy et R. L. Ochiai (2014). "Typhoid fever." Lancet **385**(9973): 1136-1145.

Wang, J. et T. Hou (2015). "Advances in computationally modeling human oral bioavailability." Adv. Drug. Deliv. Rev. **1**(86): 11-16.

Wang, M., B. Kan, J. Yang, M. Lin, J. Zeng, et al. (2014). "[Epidemiological characteristics of typhoid fever and antibiotic susceptibility testing of *Salmonella* Typhi isolates in Guangxi, 1994-2013]." Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. **35**(8): 930-934.

Wang, Q., Y. Zhao, M. McClelland et R. M. Harshey (2007). "The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes." J. Bacteriol. **189**(23): 8447-8457.

Wangdi, T., C. Y. Lee, A. M. Spees, C. Yu, D. D. Kingsbury, et al. (2014). "The Vi capsular polysaccharide enables *Salmonella enterica* serovar typhi to evade microbe-guided neutrophil chemotaxis." PLoS Pathog. **10**(8): e1004306.

Wangdi, T., S. E. Winter et A. J. Baumler (2012). "Typhoid fever: "you can't hit what you can't see"." Gut microbes **3**(2): 88-92.

Wattiau, P., C. Boland et S. Bertrand (2011). "Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives." Appl. Environ. Microbiol. **77**(22): 7877-7885.

Watts, R. E., C. K. Tan, G. C. Ulett, A. J. Carey, M. Totsika, et al. (2012). "*Escherichia coli* 83972 expressing a P fimbriae oligosaccharide receptor mimic impairs adhesion of uropathogenic *E. coli*." J. Infect. Dis. **206**(8): 1242-1249.

Weening, E. H., J. D. Barker, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, R. M. Tsois, et al. (2005). "The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice." Infect. Immun. **73**(6): 3358-3366.

Wei, J., M. B. Goldberg, V. Burland, M. M. Venkatesan, W. Deng, et al. (2003). "Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T." Infect. Immun. **71**(5): 2775-2786.

Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, et al. (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**(26): 17020-17024.

White, A. P., D. L. Gibson, G. A. Grassl, W. W. Kay, B. B. Finlay, et al. (2008). "Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Infect. Immun. **76**(3): 1048-1058.

Wiedemann, A., I. Virlogeux-Payant, A. M. Chausse, A. Schikora et P. Velge (2014). "Interactions of *Salmonella* with animals and plants." Front. Microbiol. **5**: 791.

Winter, S. E., M. Raffatellu, R. P. Wilson, H. Russmann et A. J. Baumler (2008). "The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion." Cell. Microbiol. **10**(1): 247-261.

Woodall, L. D., P. W. Russell, S. L. Harris et P. E. Orndorff (1993). "Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal lacUV5 promoter." J. Bacteriol. **175**(9): 2770-2778.

World Health Organisation. (2014). "Typhoid Fever." Retrieved 21 janvier, 2015, from <http://www.who.int/ith/vaccines/typhoidfever/en/>.

Wren, B. W. (2003). "The *yersiniae*--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens." Nat. Rev. Microbiol. **1**(1): 55-64.

Wurpel, D. J., M. Totsika, L. P. Allsopp, L. E. Hartley-Tassell, C. J. Day, et al. (2014). "F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* are expressed at low temperature and recognise Galbeta1-3GlcNAc-containing glycans." PLoS One **9**(3): e93177.

Xie, B., G. Zhou, S. Y. Chan, E. Shapiro, X. P. Kong, et al. (2006). "Distinct glycan structures of uroplakins Ia and Ib: structural basis for the selective binding of FimH adhesin to uroplakin Ia." J. Biol. Chem. **281**(21): 14644-14653.

Xu, Z. Q., M. T. Flavin et J. Flavin (2014). "Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections." Expert Opin. Investig. Drugs **23**(2): 163-182.

Yoo, A. Y., J. E. Yu, H. Yoo, T. H. Lee, W. H. Lee, et al. (2013). "Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella agf* expression." Biochem. Biophys. Res. Commun. **430**(1): 131-136.

Yue, M., S. C. Rankin, R. T. Blanchet, J. D. Nulton, R. A. Edwards, et al. (2012). "Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution." PLoS One **7**(6): e38596.

Zakikhany, K., C. R. Harrington, M. Nimtz, J. C. Hinton et U. Romling (2010). "Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Mol. Microbiol. **77**(3): 771-786.

Zavialov, A. V., J. Berglund, A. F. Pudney, L. J. Fooks, T. M. Ibrahim, et al. (2003). "Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation." Cell **113**(5): 587-596.

Zeiner, S. A., B. E. Dwyer et S. Clegg (2012). "FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Infect. Immun. **80**(9): 3289-3296.

Zeituni, A. E., R. Jotwani, J. Carrion et C. W. Cutler (2009). "Targeting of DC-SIGN on human dendritic cells by minor fimbriated *Porphyromonas gingivalis* strains elicits a distinct effector T cell response." J. Immunol. **183**(9): 5694-5704.

Zhan, R., Q. Han, C. Zhang, Z. Tian et J. Zhang (2015). "TLR2 and TLR9 play opposing roles in host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection." Infect. Immun.

Zhang, X. L., C. Morris et J. Hackett (1997). "Molecular cloning, nucleotide sequence, and function of a site-specific recombinase encoded in the major 'pathogenicity island' of *Salmonella* Typhi." Gene **202**(1-2): 139-146.

Zorgani, A. et H. Ziglam (2014). "Typhoid fever: misuse of Widal test in Libya." J. Infect. Dev. Ctries. **8**(6): 680-687.

Zorraquino, V., B. Garcia, C. Latasa, M. Echeverz, A. Toledo-Arana, et al. (2013). "Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose." J. Bacteriol. **195**(3): 417-428.

Annexe 1 : Éléments de régulation putatifs des promoteurs des FCP clonés à partir de *S. Typhi*

| Facteurs de transcription | Opérons | | | | | | | | | | | | | | Tcf * |
|---------------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-------|
| | Bcf | Csg | Fim | Pil | Saf | Sef | Sta | Stb | Stc | Std | Ste | Stg | Sth | | |
| <i>ada</i> | | | | | | | | | | √ | √ | | | | |
| <i>arcA</i> | | √ | | | | | | | | | | | | | |
| <i>argR</i> | | √ | √ | | | | √ | | √ | √ | √ | √ | | | √ |
| <i>argR2</i> | | √ | | | | √ | √ | | √ | √ | √ | | √ | | |
| <i>crp</i> | | | | | | √ | | | | | | √ | | | |
| <i>fis</i> | √ | | | | | | | | | | | √ | | | |
| <i>flhCD</i> | | | | | | | | | √ | | | | | | |
| <i>fnr</i> | | | | | | | √ | | | | | | | | |
| <i>fur</i> | | √ | | | | | | | √ | √ | | | | | √ |
| <i>gcvA</i> | √ | | | | | | | | | | √ | | | | |
| <i>H-NS</i> | | | | | | | | | | | | | | | √ |
| <i>ihf</i> | √ | √ | √ | | | √ | | | √ | | | | | | |
| <i>lexA</i> | | | | | | √ | √ | | | | | √ | | | |
| <i>Irp</i> | | √ | √ | | | √ | | | | √ | √ | | | | |
| <i>metJ</i> | | | | √ | | | √ | | | | | | | | |
| <i>metR</i> | | | | √ | | | | | | | | | | | |
| <i>nagC</i> | | | √ | | | | | | | √ | √ | | | | |
| <i>omp2</i> | | | | √ | | | | | | | | | | | |
| <i>oxyR</i> | | | √ | | | | | | | | | | √ | | |
| <i>pdhR</i> | | | | | | | | | | | | √ | | | |
| <i>phoB</i> | | √ | | | | | | | | √ | √ | | | | |
| <i>rcsB</i> | | | | | | | | | | | | | | | √ |
| <i>rpo15D</i> | | | | | | √ | | | | | | | | | |
| <i>rpo16D</i> | √ | | | | √ | √ | | | | | | | | | |
| <i>rpo17D</i> | | | | | √ | √ | √ | | | √ | | | | √ | |
| <i>rpoD19</i> | | | | | | | | | √ | √ | | | | | |
| <i>rpoE</i> | | | √ | | | | | | | | | | | | |
| <i>rpoH2</i> | | | | √ | | | | | √ | | | | | | |
| <i>rpoS17</i> | | | | | | | | | √ | | | | | | |
| <i>soxS</i> | | √ | | | √ | | | | | √ | | | | | |
| <i>tus</i> | | | | | | | | | | | √ | | | | |
| <i>tyrR</i> | | | | | | √ | | √ | | | | √ | | | |

Légende : Éléments de régulation putatifs retrouvés dans les séquences en amont du premier gène de chacun des opérons codant pour les 14 systèmes d'adhésion de *S. Typhi*. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel BPROM disponible en ligne (Softberry Inc. 2015). √ : Présence de l'élément de régulation, * : L'analyse du promoteur de Tcf a été effectuée dans le cadre d'une étude précédente (Leclerc 2014). En gras : mutants disponibles chez la souche à l'étude.